

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

MICROBIOLOGY LABORATORY

**EFFET DE QUELQUES PARAMETRES SUR L'ELIMINATION DES
BIOFILMS PAR LES PRATIQUES DE NETTOYAGE DE RUE DES
BOUTEILLES PLASTIQUES REUTILISEES POUR LE MARCHE DES
BOISSONS SUCREES**

Mémoire rédigé en vue de l'obtention du Diplôme de MASTER en Microbiologie

Option : Microbiologie Alimentaire et Industrielle



Rédigé par :

VOULA MFOULA Manuel Harry

Matricule : **18J2648**

Licencié en Biosciences option Microbiologie

Sous le co-encadrement de

SADO KAMDEM Sylvain

Professeur (UY1)

TCHUENCHIEU KAMGAIN Alex

Chargé de Recherche (IMPM)

Année Académique : 2023 - 2024

DEDICACE

**A mes très chers parents Mr MFOULA Parfait et Mme
NGANGUE Catherine Epse MFOULA**

REMERCIEMENTS

Ma sincère gratitude va :

Au Pr ESSIA NGANG Jean Justin, Chef du Département de Microbiologie ainsi qu'à tous les enseignants du Département pour le savoir qu'ils m'ont transmis ;

Au Pr SADO Sylvain pour avoir encadré ce travail d'une main de maître, la perfection se trouvant dans le détail vous avez su éclaircir les points d'ombre de ce travail ;

Au Dr TCHUENCHIEU Alex pour son encadrement sur le plan académique mais également sur le plan social. Vos conseils, votre sens du travail bien fait et votre volonté de toujours transmettre m'ont permis de donner le meilleur de moi et d'en ressortir grandi ;

Aux membres du jury de ce travail, pour avoir accepté de l'évaluer ;

Au Pr ESSAME OYONO Jean Louis, Directeur Général de l'Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales (IMPM) pour avoir accepté que je puisse faire un stage dans les locaux de cet institut pour réaliser ce travail ;

Au Dr NKOUE Abraham pour m'avoir fourni les outils nécessaires lors de l'analyse des données ;

A Mademoiselle DJIWOUAKAM SOPPI, Mademoiselle EPOSSI Lydienne et Mademoiselle YAP Liza qui m'ont apporté gentiment leur soutien sans quoi la réalisation de ce travail n'aurait pas été chose aisée ;

A Mademoiselle MOGA Christelle pour les corrections et apports intellectuels qu'elle a bien voulu partager avec moi ;

A Mademoiselle ADJELE Jorelle pour son accompagnement, ses conseils et sa précieuse aide lors des manipulations ;

A Monsieur EDOUN Ferdinand pour les précieux réactifs de laboratoire qu'il m'a fourni ;

A Madame BENGUE Annick, Mademoiselle TCHUENO Joëlle, Monsieur BALEBA Emile, Monsieur MEDJO Evrard pour leurs aides, conseils avisés et les bons moments passer ensemble lors de mon stage à l'IMPM ;

A mes aînés du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I pour les corrections apportées à ce travail ;

A mes camarades de promotion pour leurs idées, assistance et aide ;

A mes parents, frères, sœurs et amis qui ont su me mettre dans un environnement favorable à l'avancée de mes travaux particulièrement sur le plan mental, émotionnel et financier ;

A l'endroit de tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce mémoire, Merci !

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

BN : Bouillon nutritif

BPR : Bouteilles Plastiques Réutilisées

cell/mL : Cellules/millilitre

°C : Degré Celsius

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

g/L : Grammes/litre

h : Heures

mL : Millilitres

min : Minutes

MOA : Maladies d'origine alimentaire

nm : Nanomètres

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

% : Pourcentage

pH : Potentiel hydrogène

µm : Micromètres

ufc/mL : Unité formant colonie/millilitre.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition des détergents utilisés pour l'élimination des biofilms.	18
Tableau 2 : Traitements tests et témoins.	20
Tableau 3 : Plan expérimental pour la formation des biofilms avec des valeurs codées.	23
Tableau 4 : Valeurs réelles des niveaux des facteurs.	24
Tableau 5 : Plan expérimental décodé avec les valeurs réelles des niveaux des facteurs.	24
Tableau 6 : Paramètres des boissons sucrées achetées dans la rue avant ensemencement.	27
Tableau 7 : Pourcentage de réduction après traitement des biofilms formés par la flore du bouillon non stérile.	30
Tableau 8 : Pourcentage de réduction après traitement des biofilms formés par <i>Salmonella Enteritidis</i>	31
Tableau 9 : Pourcentage de réduction après traitement des biofilms formés par <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Tableau 10 : Pourcentage de formation des biofilms et charges en cellules planctoniques de <i>Staphylococcus aureus</i> et de <i>Salmonella Enteritidis</i> en fonction des conditions de croissance.	33
Tableau 11 : Pourcentage de réduction des biofilms <i>Salmonella Enteritidis</i> en fonction des conditions de croissance et des traitements appliqués.	38
Tableau 12 : Pourcentage de réduction des biofilms <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction des conditions de croissance et des traitements appliqués.	39
Tableau 13 : Quantification des biofilms formés dans les boissons sucrées et charges en cellules planctoniques associées.	40
Tableau 14 : Pourcentage de réduction des biofilms microbiens formés dans des boissons sucrées locales.	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Etapes de formation des biofilms	8
Figure 2 : Vue microscopique de <i>Salmonella Enteritidis</i>	10
Figure 3 : Vue microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figure 4 : Aperçu des tubes Falcon en polyéthylène téréphtalate.....	18
Figure 5 : Aperçu du spectrophotomètre, vortex et pH-mètre utilisés.....	19
Figure 6 : Effet du pH et du sucre sur la formation des biofilms de <i>Staphylococcus aureus</i> à 2,5% de protéine et 36h d'incubation.....	35
Figure 7 : Effet du pH et des protéines sur la formation des biofilms de <i>Staphylococcus aureus</i> à 15% de sucre et 36h d'incubation.....	35
Figure 8 : Effet du pH et des protéines sur la formation des biofilms de <i>Salmonella Enteritidis</i> à 15% de sucre et 36h d'incubation.....	36
Figure 9 : Effet de la teneur en sucre et du temps d'incubation sur la formation des biofilms de <i>Salmonella Enteritidis</i> à pH 5 et 2,5% de protéine.	37
Figure 10 : Aperçu de quelques solutions éthanoliques dans lesquelles sont dissous du cristal violet.....	56

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture.....	56
Annexe 2 : Quelques photos de manipulation.	56

RESUME

L'élimination des biofilms formés dans les bouteilles plastiques réutilisées (BPR) est un réel challenge afin de préserver la santé des consommateurs des boissons sucrées de la rue. En effet, il existe de nombreuses pratiques de nettoyage de rue des BPR dont l'efficacité pourrait varier selon les conditions de formation des biofilms. Celles-ci influenceraient la résistance des biofilms aux agressions extérieures. C'est ainsi que le travail mené avait pour objectif d'hierarchiser les pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques permettant d'éliminer les biofilms de *Salmonella Enteritidis* et de *Staphylococcus aureus* formés dans différentes conditions. Pour ce faire, des pratiques de nettoyage de rue des BPR issues de la littérature ont été appliquées sur des biofilms formés par chacune des souches cibles en monoculture dans un bouillon nutritif et ceux formés par la flore d'un bouillon nutritif non stérile. Les traitements testés comprenaient des combinaisons d'eau froide ou chaude couplées à des détergents (chimique ou enzymatique), un passage au vortex ou l'utilisation d'une brosse (témoin). Par la suite, un plan expérimental CCD a été utilisé afin d'évaluer l'effet du pH (3 à 7), % protéine (0 à 5%), % sucre (5 à 25%) et du temps d'incubation (12 à 60h) sur la formation des biofilms des souches cibles. Les conditions du plan expérimental où les quantités de biofilms de chaque souche étaient les plus élevées à chaque pH ont été retenues afin de tenir compte de la diversité de boissons sucrées, et les traitements les plus communs pratiqués dans la rue ont été appliqués sur les biofilms issus de ces conditions. Les résultats obtenus ont montré que les traitements sans détergents étaient significativement moins efficaces que ceux avec les détergents. Les traitements avec le détergent enzymatique avaient tendance à être plus efficaces que ceux avec le détergent chimique, bien qu'il n'existât pas toujours de différence significative entre leur niveau de réduction des biofilms. L'ajout de l'agitation avec le vortex ou du brossage améliorait l'élimination des biofilms. En ce qui concerne la formation des biofilms dans différentes conditions, *S. aureus* avait tendance à produire plus de biofilms que *S. Enteritidis*. L'augmentation du pH vers le neutre, du % protéine et du temps d'incubation favorisaient la formation des biofilms, à l'inverse de l'augmentation du % sucre qui la réduisait. La formation des biofilms de *S. aureus* était significativement dépendante du % sucre et celle de *S. Enteritidis* du pH ($p < 0,05$). L'efficacité des traitements variait significativement selon les conditions du plan expérimental retenues pour la formation des biofilms. Toutefois, peu importe la condition de formation, aucun traitement n'a été capable d'éliminer la totalité des biofilms formés, le pourcentage de réduction le plus élevé étant de 62,5%. Les biofilms résiduels représenteraient de ce fait un danger pour la santé des consommateurs des boissons de la rue.

Mot clés : *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, biofilms, pratique de rue de nettoyage.

ABSTRACT

The elimination of biofilms formed in reused plastic bottles (RPB) is a real challenge in order to preserve the health of street sugar beverage consumers. Indeed, there are many street cleaning practices for RPB whose effectiveness may vary depending on the conditions of biofilm formation. These would influence the resistance of biofilms to external aggression. Thus, the aim of the work was to hierarchize the street cleaning practices of plastic bottles to eliminate the biofilms of *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus* formed in different conditions. To do this, literature-based street cleaning practices of RPB have been applied to biofilms formed by each of the target strains in monoculture in a nutritious broth and those formed from the flora of a non-sterile nutrient broth. The treatments tested included combinations of cold or hot water coupled with detergents (chemical or enzymatic), a passage to the vortex or the use of a brush (test). Subsequently, an experimental CCD plan was used to evaluate the effect of pH (3 to 7), % protein (0 to 5%), % sugar (5 to 25%) and incubation time (12 to 60 hours) on target strain biofilm formation. The conditions of the experimental plan where the highest quantities of biofilms in each strain at each pH were selected to consider the diversity of sweetened beverages, and the most common treatments in the street were applied to biofilm derived from these conditions. The results showed that detergent-free treatments were significantly less effective than those with detergents. Enzyme detergent treatments tended to be more effective than those with chemical detergents, although there was not always a significant difference between their level of biofilm reduction. The addition of vortex agitation or brushing improved biofilm removal. With regard to biofilm formation under different conditions, *S. aureus* tended to produce more biofilms than *S. Enteritidis*. The increase in pH to neutral, % protein and incubation time promoted the formation of biofilms, as opposed to the increase in % sugar that reduced it. The biofilm formation of *S. aureus* was significantly dependent on %sugar and *S. Enteritidis* on pH ($p < 0.05$). The effectiveness of the treatments varied significantly depending on the experimental plan conditions for biofilm formation. However, regardless of the condition of formation, no treatment has been able to remove all of the biofilms formed, with the highest reduction percentage of 62.5%. Residual biofilms would therefore pose a health hazard to street drink consumers.

Keywords: *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, biofilms, street cleaning practice.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES ANNEXES	vi
RESUME.....	vii
ABSTRACT	viii
SOMMAIRE	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE	3
I. BOISSONS SUCREES LOCALES VENDUES DANS LES BPR ET PROFIL MICROBIOLOGIQUE ASSOCIE.....	4
I.1. Présentation des boissons sucrées locales vendues dans les BPR	4
I.2. Profil microbiologique des boissons sucrées locales.....	4
II. BIOFILMS.....	6
II.1. Généralités sur les biofilms	6
II.2. Formation des biofilms.....	6
II.3. Propriétés de résistance des biofilms	9
III. DESCRIPTION DES MICROORGANISMES CIBLES DE L'ETUDE ET CARACTERISTIQUES DE LEURS BIOFILMS	10
III.1. <i>Salmonella Enteritidis</i>	10
III.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
IV. MOYENS DE LUTTE CONTRE LES BIOFILMS ET PRATIQUES DE NETTOYAGE DE RUE DES BPR.....	13
IV.1. Principaux moyens de lutte contre les biofilms	13
IV.2. Pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques réutilisées (BPR)	14
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	16
I. MATERIEL.....	17
I.1. Souches microbiennes et milieux de culture	17
I.2. Boissons sucrées locales et détergents achetés.....	17
I.3. Supports de fixation des biofilms.....	18
I.4. Réactifs et équipements utilisés	19

II. METHODES	20
II.1. Evaluation de l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques sur l'élimination des biofilms de <i>Salmonella Enteritidis</i> et de <i>Staphylococcus aureus</i>..	20
II.1.1. Pratiques de nettoyage de rue des BPR testées	20
II.1.2. Production de biofilms.....	21
II.1.3. Quantification des biofilms avant et après application des différentes pratiques de nettoyage de rue	22
II.2. Etude de la formation des biofilms en simulant les conditions nutritionnelles des boissons sucrées vendues dans des BPR	23
II.2.1. Production de biofilms dans différentes conditions de croissance	23
II.2.2. Evaluation de la charge microbienne après culture et quantification des biofilms formés	25
II.3. Détermination de l'influence des conditions de formation des biofilms des souches cibles sur l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue des BPR.....	26
II.3.1. Production de biofilms dans différentes conditions de croissance sélectionnées	26
II.3.2. Quantification des biofilms avant et après application des différentes pratiques de nettoyage de rue des BPR.....	26
II.3.3. Validation des résultats	27
II.4. Analyses statistiques	28
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	29
I. RESULTATS.....	30
I.1. Efficacité des pratiques de nettoyage de rue des BPR sur l'élimination des biofilms microbiens	30
I.1.1. Réduction des biofilms formés à partir du bouillon non stérile.....	30
I.1.2. Réduction des biofilms formés par <i>Salmonella Enteritidis</i>	31
I.1.3. Réduction des biofilms formés par <i>Staphylococcus aureus</i>	32
I.2. Formation des biofilms par les souches ciblées en simulant les conditions nutritionnelles des boissons sucrées commercialisées dans des BPR.....	33
I.2.1. Influence des facteurs sélectionnés sur la formation des biofilms	33
I.2.2. Modélisation de la formation des biofilms en fonction des facteurs d'étude ...	34
I.3. Influence des conditions de formation des biofilms des souches cibles sur l'efficacité des traitements	37
I.3.1. Influence des conditions de formation des biofilms de <i>Salmonella Enteritidis</i> sur l'efficacité des traitements.....	37

I.3.2. Influence des conditions de formation des biofilms de <i>Staphylococcus aureus</i> sur l'efficacité des traitements.....	39
I.3.3. Formation des biofilms dans un lait caillé, un jus d'hibiscus et un jus de baobab et influence sur l'efficacité des traitements.....	40
II. DISCUSSION	42
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	47
CONCLUSION.....	48
PERSPECTIVES.....	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50
ANNEXES.....	55

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les maladies d'origine alimentaire (MOA) sont des affections causées par des agents infectieux ou toxiques pénétrant l'organisme par le biais des aliments ingérés. Chaque année, elles touchent près de 600 millions de personnes à travers le monde en causant la mort d'environ 420 000 (OMS, 2020). L'Afrique est le continent où l'on déplore le plus grand nombre de cas, soit 91 millions avec 137 000 décès par an (WHO, 2022). Les agents responsables de ces maladies sont généralement des bactéries, virus, parasites, toxines et des composés chimiques. Parmi les microorganismes les plus incriminés dans les cas de MOA on retrouve les Salmonelles non typhiques au sein desquelles *Salmonella Enteritidis* qui est responsable de près de 85% de cas en Europe et 32 000 cas de décès par an en Afrique (Webber *et al.*, 2019 ; WHO, 2015) et *Staphylococcus aureus* dont 30% de la population mondiale en seraient porteurs (OMS, 2020). Cette prévalence élevée en Afrique serait la conséquence de l'importante consommation d'aliments de rue souvent sujets à des contaminations microbiennes (Henry *et al.*, 2017 ; Ngueugang *et al.*, 2021 ; Salamandane *et al.*, 2021).

En effet, une grande fraction de la population des pays en voie de développement est friande à la consommation des aliments de la rue (Rana & Ahirrao, 2016) à l'exemple des boissons sucrées locales conditionnées dans des bouteilles plastiques réutilisées (BPR). Ces bouteilles proviennent de sources diverses et très souvent des poubelles (Mouafo *et al.*, 2022). Elles entrent ainsi en contact durant de nombreuses heures avec des germes pathogènes ayant la capacité de former des structures résistantes aux agents de nettoyage appelées biofilms (Licciardello, 2024 ; Mouafo *et al.*, 2022). Un biofilm est un micro-écosystème adhérent à un support, constitué d'une communauté de microorganismes variés, enrobée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (Remy, 2015). Les biofilms sont responsables de nombreuses infections en milieu hospitalier et dans le secteur alimentaire. Contrairement aux cellules planctoniques plus sensibles que celles enveloppées par une matrice (Bridier *et al.*, 2011 ; Roux & Ghigo, 2006), les microorganismes du biofilm ont de grandes capacités de résistance aux antimicrobiens comme les antibiotiques ou les désinfectants (Roux & Ghigo, 2006). Le biofilm constitue ainsi un réservoir de microorganismes particulièrement critique, difficile à éliminer et libérant des germes qui contaminent les milieux environnants (Fastrez & Delhalle, 2022 ; González-Rivas *et al.*, 2018 ; String *et al.*, 2020). Dans le souci d'assainir les bouteilles plastiques utilisées, une pléthore de pratiques de nettoyage de rue des BPR a été recensée, toutefois, l'efficacité de celles-ci face aux biofilms n'est pas certaine compte tenu de leurs propriétés de résistance (Mouafo *et al.*, 2022). Ceci constitue une réelle préoccupation,

en considérant l'impact des germes infectieux sur la santé des consommateurs des aliments de la rue.

La formation des biofilms est influencée par de nombreux facteurs notamment la nature et la composition du substrat de croissance des microorganismes qui les forment (**Pessereau, 2015**). Or, il existe une multitude de boissons sucrées locales vendues au Cameroun à l'exemple des laits fermentés (Kossam), jus d'*Hibiscus sabdariffa* (foléré), jus de *Zingiber officinale* (gingembre), jus d'*Adansonia digitata* (baobab), jus de *Citrus limon* (citron) et jus de fruits. Ces boissons se différencient par le type des matières premières utilisées, par la présence d'antimicrobiens naturellement présents mais particulièrement par leur teneur en protéines, en sucres et leur pH. Ceci suggère une différence dans les caractéristiques des biofilms formés dans les BPR et donc de potentielles variations des niveaux de résistance aux agents de nettoyage. C'est ainsi que ce travail avait pour but d'hierarchiser les pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques réutilisées permettant d'éliminer les biofilms de *Salmonella Enteritidis* et de *Staphylococcus aureus* selon leurs conditions de formation. Plus spécifiquement, il s'agissait :

- D'évaluer l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques réutilisées (BPR) sur l'élimination des biofilms de *Salmonella Enteritidis* 155A et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
- D'étudier la formation des biofilms des souches précédentes en simulant les conditions nutritionnelles des boissons sucrées commercialisées dans des BPR ;
- De déterminer l'influence des conditions de formation des biofilms de ces microorganismes sur l'efficacité des traitements.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE

I. BOISSONS SUCREES LOCALES VENDUES DANS LES BPR ET PROFIL MICROBIOLOGIQUE ASSOCIE

I.1. Présentation des boissons sucrées locales vendues dans les BPR

La consommation d'aliments de la rue est une habitude alimentaire appréciée par une grande fraction de la population des pays en voie de développement (**Rana & Ahirrao, 2016**). Les aliments de la rue sont divers et parmi eux il se distingue les boissons sucrées locales. Ces dernières peuvent être différenciées les unes des autres sur la base de leurs caractères intrinsèques à l'exemple de la nature des matrices utilisées pour leur production, leur teneur en sucres, en protéines ou encore en fonction de leur pH. Les boissons sucrées locales généralement rencontrées dans la rue au Cameroun et à Yaoundé en particulier sont les jus d'*Hibiscus sabdariffa* (foléré), les laits fermentés (kossam), du jus de *Zingiber officinale* (gingembre), du jus d'*Adansonia digitata* (baobab), jus de *Citrus limon* ou encore des jus de fruits (**Mouafo et al., 2022**). Elles sont pour la plupart faites maison et les proportions des ingrédients varient d'un producteur à un autre. Très appréciées, ces boissons sont généralement conditionnées dans des bouteilles plastiques réutilisées (BPR).

Les bouteilles utilisées pour la commercialisation des boissons sucrées de la rue proviennent de divers horizons et notamment des poubelles (**Mouafo et al., 2022**). Les bouteilles plastiques usagées abondantes dans les rues, jetées après avoir été utilisées, sont devenues un moyen de conditionnement facile d'accès pour les commerçants. La présence des facteurs de risques tels que la non maîtrise des règles d'hygiène lors de la production ou encore l'origine douteuse des bouteilles plastiques servant au conditionnement font de la consommation des boissons sucrées de rue un potentiel danger pour la santé (**Ogodo et al., 2016**).

I.2. Profil microbiologique des boissons sucrées locales

La consommation des boissons de la rue est souvent désignée comme la cause de maladies alimentaires. Celles-ci sont en grande partie sujettes à des contaminations dont l'origine est couramment rapportée à la non maîtrise des règles d'hygiène par les producteurs, à la contamination du matériel utilisé ou encore à la mauvaise qualité des ingrédients utilisés (**Bello et al., 2014 ; Ogodo et al., 2016**). L'évaluation de qualité microbiologique des eaux et boissons commercialisées dans la région de l'Extrême-Nord Cameroun en 2016 montre qu'elles sont contaminées par différentes flores, notamment les coliformes totaux à des charges de l'ordre de 3 log ufc/mL (**Maïworé et al., 2016**) et donc hors norme (absence) (**Division de la sécurité alimentaire du Luxembourg, 2018**). Au Nigéria, des études ont montré que les jus

de fruits vendus dans certaines localités sont contaminés par des microorganismes à des charges de l'ordre de 4 log ufc/mL. Les germes qui sont *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sp*, *Salmonella sp*, *Streptococcus sp*, *Proteus sp*, *Serratia sp*, *Rhizopus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Aspergillus spp.*, et *Saccharomyces cerevisiae* ont été révélés (Bello *et al.*, 2014 ; Ogodo *et al.*, 2016). Ces microorganismes retrouvés dans les boissons locales peuvent être responsables de plusieurs maladies à l'instar des toxi-infections alimentaires. Dans ce cas, parmi les germes les plus incriminés on retrouve les Salmonelles dont *Salmonella Enteritidis* qui est selon l'OMS l'un des sérovars les plus létaux et *Staphylococcus aureus* qui est un germe ubiquitaire ayant plusieurs facteurs de virulence à l'exemple de sa toxine (OMS, 2020). Notons que ces germes peuvent provenir de la mauvaise hygiène des commerçants mais également des BPR dans lesquels est fait le conditionnement.

La contamination des bouteilles plastiques réutilisées avant ou après lavage local a été le sujet de quelques études. En effet, les travaux menés par Abrokwah *et al.* (2020) dans la ville d'Accra (Ghana) ont montré que 60% des BPR analysées étaient contaminées par des coliformes totaux et 40% d'entre-elles par des coliformes fécaux. Le niveau de contamination des bouteilles après utilisation peut varier en fonction de la boisson qu'elles contenaient (Sun *et al.*, 2017). Les travaux menés par Sun *et al.* (2017) ont montré que les bouteilles ayant contenu de l'eau sept jours avant leur analyse avaient une charge microbienne significativement moins importante (3 log ufc/mL) que celles ayant contenu des boissons sucrées (5 log ufc/mL). La différence de charge serait rapportée à la présence de résidus de boissons sucrées dans les bouteilles qui contiendraient des éléments nutritifs à l'exemple des sucres et des protéines favorisant la croissance microbienne (Sun *et al.*, 2017). L'usage répété des bouteilles génère leur contamination par des germes ayant la capacité de former des biofilms sur des surfaces plastiques (Licciardello, 2024). Les travaux de Mouafo *et al.* (2022) dans la ville de Yaoundé (Cameroun) ont révélé qu'indépendamment du procédé de nettoyage de rue appliqué, toutes les BPR analysées contenaient encore des biofilms résiduels. La réutilisation des bouteilles plastiques pour le conditionnement des boissons est alors une réelle préoccupation. Les germes résiduels sous la forme planctonique et particulièrement ceux agglomérés en biofilms pourraient contaminer les nouvelles boissons (Licciardello, 2024), ce qui aurait de graves implications pour la santé des consommateurs des boissons de rue.

II. BIOFILMS

II.1. Généralités sur les biofilms

Sur des surfaces inertes ou non, s'agglomèrent des communautés microbiennes, bactéries et/ou champignons qui sécrètent des polysaccharides, des protéines et libèrent de l'ADN constituant une matrice extracellulaire et dont l'ensemble matrice et communauté microbienne forme une structure hétérogène appelée biofilm (**Tremblay *et al.*, 2014**). Les biofilms sont des communautés hétérogènes dynamiques en constant changement. Ils peuvent se composer d'une seule espèce de bactérie ou de champignon ou, plus fréquemment, ils peuvent être polymicrobiens (**Boutaleb, 2007**). Tous les microorganismes ne sont pas capables de former des biofilms, et cette capacité varie en fonction de l'espèce et des conditions environnementales (**Tremblay *et al.*, 2014**). On estime que 80% de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme de biofilm, les bactéries étant les principaux composants (**Boels & Blackman, 2016**).

La matrice inclut tout élément du biofilm autre que les microorganismes. Elle est majoritairement composée d'eau (jusqu'à 97%) et de substances polymériques extracellulaires (EPS) (**Roux & Ghigo, 2006**). La matière sèche des EPS est principalement constituée de polysaccharides sécrétés par les microorganismes et de protéines (70 à 80%), de produits de dégradation, de substances provenant du milieu extérieur et d'autres composants, à l'exemple de l'ADN, de l'ARN et des lipides (**Liu *et al.*, 2024**). Elle a pour rôle de protéger les microorganismes qu'elle renferme des variations et agressions extérieures et présente une très forte résistance aux agents de nettoyage et de désinfection. En effet, la matrice jouerait un rôle de barrière de diffusion à la pénétration de molécules toxiques (**Roux & Ghigo, 2006 ; Roy *et al.*, 2018**). Les microorganismes peuvent donc se développer aisément au sein de cette enveloppe protectrice et contaminer le milieu environnant, ce qui fait du biofilm un réservoir en germes particulièrement critique et difficile à éliminer (**Fastrez & Delhalle, 2022**).

II.2. Formation des biofilms

Les microorganismes sous la forme planctonique passent à l'état de biofilm sous l'influence des contraintes environnementales pouvant être de nature chimique ou physique (pH, température, osmolalité, concentration en nutriments, en oxygène, en fer). Ce changement d'état nécessite une signalisation intercellulaire génétiquement programmée appelée *Quorum Sensing* (QS) (**Toyofuku *et al.*, 2016**). Plus précisément, les bactéries sécrètent dans leur milieu des molécules qui vont s'accumuler avec l'augmentation de la densité cellulaire et celles-ci seront reconnues par d'autres bactéries environnantes. A un seuil de concentration des

molécules sécrétées, l'expression génétique des bactéries autant que leur comportement changent complètement, conduisant à la formation de biofilms (**Roux & Ghigo, 2006 ; Targant, 2010**). La formation de biofilm est décrite selon plusieurs auteurs en cinq étapes dont l'attachement initial, l'attachement irréversible, la première et deuxième phase de maturation et la dispersion des microorganismes (**Roux & Ghigo, 2006 ; Targant, 2010 ; Toyofuku *et al.*, 2016**).

- **L'attachement initial** : à la suite des signaux environnementaux perçus, les bactéries tentent de se positionner sur une surface et d'y adhérer. Les adhésines (flagelles et pili) sont les principales structures bactériennes mises en jeu à cette étape. Cette phase d'attachement initial est un processus réversible.
- **L'attachement irréversible** : à mesure que les cellules croissent et se multiplient, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible. L'attachement irréversible nécessite l'intervention d'adhésines dites secondaires. Durant cette étape, les bactéries émettent des signaux intercellulaires qui initient la production de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui permettront d'emprisonner les nutriments et les bactéries environnantes encore sous la forme planctonique.
- **Première phase de maturation** : à cette phase, les bactéries initiales se divisent et celles environnantes s'attachent au biofilm en formation. Les colonies agrégées constituent des micro-colonies formant un film d'une épaisseur d'environ 10 µm.
- **Deuxième phase de maturation** : elle renvoie à la formation de macro-colonies d'épaisseur supérieure à 100 µm et à la structuration du biofilm. Les espaces séparant les microorganismes recouverts par la matrice deviennent les canaux du biofilm par lesquels les fluides nutritifs peuvent circuler et servent également à l'expulsion des produits de dégradation.
- **La dispersion** : à ce stade du cycle, certaines cellules du biofilm mature se détachent et rentrent dans la phase de dissémination et de colonisation de nouvelles surfaces sous la forme planctonique. Les mécanismes de la dispersion n'ont pas encore été totalement élucidés. Ceux-ci se serviraient d'enzymes dégradant les adhésines, un retour de la motilité, la production de surfactant et la lyse cellulaire.

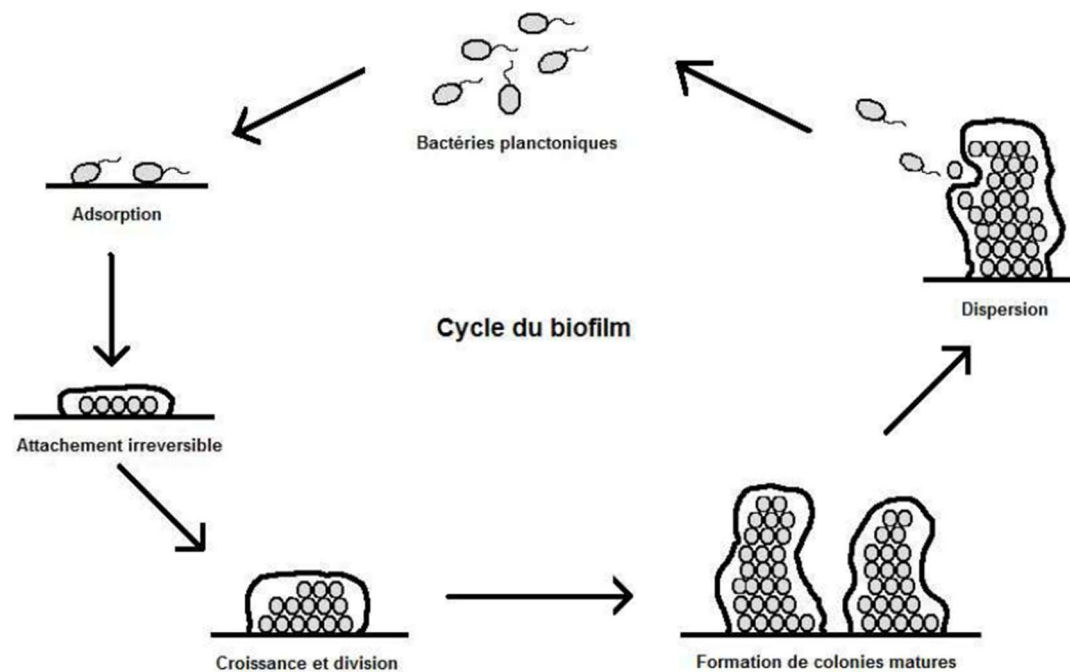


Figure 1 : Etapes de formation des biofilms (Targant, 2010).

La formation de biofilm est influencée par plusieurs facteurs parmi lesquels la flore microbienne qui le constitue, le support de fixation et les conditions environnementales (Gemba *et al.*, 2022 ; Pessereau, 2015 ; Remy, 2015).

- **La flore microbienne**

Les biofilms composés de plusieurs espèces sont plus résistants que n'importe quel biofilm à une seule espèce face aux agents de désinfection (Bridier *et al.*, 2011). Les propriétés physicochimiques d'adhésion de la paroi cellulaire (charge, caractère hydrophobe/hydrophile, acide ou basique) sont fonction du métabolisme des microorganismes. Ces propriétés varient selon les conditions de culture (température, pH ou composition du milieu), le type de Gram (positif ou négatif) ou encore l'espèce bactérienne (Vashchenko *et al.*, 2021). La formation de biofilms est influencée par l'état physiologique des cellules. L'attachement serait meilleur en phase exponentielle de croissance en comparaison à la phase stationnaire. En revanche, certains microorganismes seraient plus hydrophobes durant la phase stationnaire et adhèreraient mieux lors de celle-ci par rapport à la phase exponentielle (Boutaleb, 2007).

- **Le support de fixation**

La plupart des surfaces organiques favorisent mieux la formation de biofilms en comparaison aux supports métalliques, ceci étant dû à la divergence de leurs propriétés de

surface (**Pessereau, 2015**). En ce qui concerne les matériaux abiotiques, ils peuvent être classés selon leur aptitude à favoriser la formation de biofilms. C'est ainsi que, les supports en polybutylène promeuvent le mieux la formation de biofilms suivi du polyéthylène, le polychlorure de vinyle surchloré et du cuivre (**Yu et al., 2010**).

- **Les conditions environnementales**

Les propriétés physicochimiques du milieu, à l'exemple du pH des espèces ioniques dissoutes et de la température, ont un important rôle lors de la formation des biofilms. A des pH neutres ou légèrement alcalins, la majorité des bactéries a tendance à former d'importants biofilms (**Boutaleb, 2007**). La température influence l'activité métabolique et enzymatique des bactéries et certains paramètres physicochimiques ainsi que leurs propriétés de surface (**Cappello & Guglielmino, 2006**). Les concentrations des éléments nutritifs tels que le carbone organique, l'azote ou le phosphore influencent également les capacités des microorganismes à former un biofilm. Le stress nutritionnel en rapport à la limitation de ces éléments peut conduire à la dispersion du biofilm (**Pessereau, 2015 ; Polanska et al., 2005**).

II.3. Propriétés de résistance des biofilms

Les biofilms sont responsables de nombreuses infections en milieu hospitalier et dans le secteur alimentaire et leur élimination est une réelle préoccupation (**Hoceini et al., 2023**). A l'inverse des bactéries sous la forme planctonique, celles du biofilms sont généralement plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants (**Bridier et al., 2011 ; Roux & Ghigo, 2006**). En effet, les bactéries du biofilm peuvent acquérir une résistance aux agents antimicrobiens 10 à 1000 fois supérieure en comparaison à leur état planctonique (**Tremblay et al., 2014**).

Les propriétés de résistance ou tolérance des biofilms face aux agents antimicrobiens peuvent être dues à de nombreux facteurs. La matrice composée d'EPS agirait comme une barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens (**Boels & Blackman, 2016**). Tout comme les agents antimicrobiens, les nutriments et l'oxygène ont du mal à traverser le biofilm ce qui peut ralentir le métabolisme des bactéries. Ceci entraîne le passage à un état de dormance de certaines bactéries, responsables de la tolérance aux changements extérieurs (**Tremblay et al., 2014**). La disposition spatiale des microorganismes dans le biofilm favorise également le transfert horizontal de gènes codant pour la résistance aux médicaments et d'autres facteurs de virulence (**Hoceini et al., 2023**).

III. DESCRIPTION DES MICROORGANISMES CIBLES DE L'ETUDE ET CARACTERISTIQUES DE LEURS BIOFILMS

III.1. *Salmonella Enteritidis*

Les Salmonelles sont des bactéries anaérobies facultatives, Gram négatives en forme de bâtonnet dont la taille varie entre 2 à 5 microns de long sur 0,5 à 1,5 microns de large et possédant des flagelles péritriches (figure 2) (Andino & Hanning, 2015).

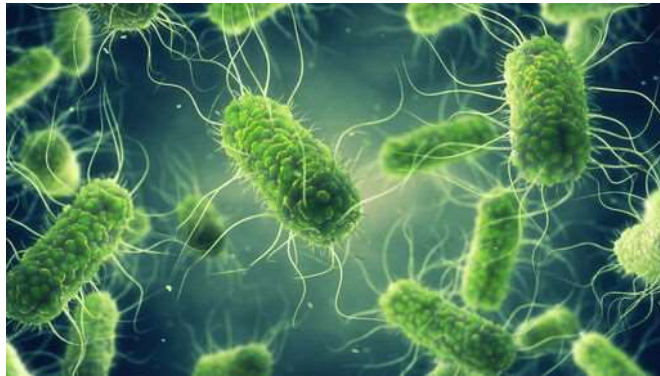


Figure 2 : Vue microscopique de *Salmonella Enteritidis* (European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2023).

De la famille des *Enterobacteriaceae*, les Salmonelles sont des agents pathogènes fréquents pour les humains et les animaux. Le genre *Salmonella* est composé de 2 espèces à savoir *S. enterica* et *S. bongori*. L'espèce *S. enterica* est subdivisée en 6 sous-espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica* sur la base de modifications génomiques et biochimiques (Andino & Hanning, 2015). Chaque sous-espèce est subdivisée en plusieurs sérotypes (2 579 sérovars) définis par leur formule antigénique. Généralement, les Salmonelles sont des fermenteurs de lactose, des producteurs de sulfite, d'hydrogène, oxydase négative et catalase positive. Les Salmonelles se développent à des intervalles de température comprises entre 5 et 47°C environ, avec un optimum à 35/37°C et ont une plage de pH optimal de 6,5 à 7,5. *Salmonella Enteritidis* croît préférentiellement dans des milieux avec une activité de l'eau allant de 0,945 à 0,999 et est sensible aux NaCl (Peiffer, 1999).

Salmonella Enteritidis est l'un des sérotypes de Salmonelle les plus récurrents dans les cas de toxi-infections alimentaires (Kang *et al.*, 2006 ; OMS, 2020 ; Webber *et al.*, 2019) au rang desquels ceux liés à la consommation des aliments de la rue contaminés à l'exemple des boissons sucrées locales. *S. Enteritidis* est la principale cause d'épidémies de toxi-infections alimentaires, en grande partie en Europe où elle est responsable de près de 85% des cas (Webber *et al.*, 2019). Cette souche est responsable de salmonellose et de toxi-infection alimentaire. La dose minimale infectieuse de ce germe est généralement comprise entre 2 à 3

log cell/mL, bien que des doses de 10 cellules ou moins ont déjà provoqué des maladies (**Putturu et al., 2015**). Les salmonelloses se manifestent par la survenue brutale de fièvre, de douleurs abdominales, de diarrhée, des nausées et parfois des vomissements. Les symptômes apparaissent généralement 6 à 72 heures après l'ingestion de Salmonelles et l'affection dure 2 à 7 jours. Les salmonelloses ne sont généralement pas des maladies graves et dans la majorité des cas les patients guérissent sans traitement particulier. Toutefois certains patients à l'exemple des jeunes enfants ou les personnes âgées peuvent manifester des symptômes de la maladie plus importants dus à une déshydratation, pouvant aboutir à la mort (**OMS, 2018**). En Afrique, les Salmonelles non typhiques sont responsables du plus grand nombre de décès dans les cas des maladies diarrhéiques liées à la consommation d'aliments contaminés, soit près de 32 000 par an, ce qui représente la moitié des décès mondiaux dus à ces Salmonelles (**WHO, 2015**). Le manque de données dans certaines régions en particulier dans les pays en voie de développement ne permet pas de mesurer le réel impact des salmonelloses au sein des populations. La prévalence élevée des cas de maladies d'origine alimentaire liées à *S. Enteritidis* serait la résultante des nombreuses propriétés ou facteurs de virulence qui lui sont propres. Ces derniers peuvent être regroupés en deux classes dont, ceux spécifiques (îlots de pathogénicité, dans une moindre mesure des plasmides de virulence et des phages) et non spécifiques (lipopolysaccharide ou LPS, fimbriae ou pili, flagelle) (**Bellal & Brahim, 2021**). *S. Enteritidis* a également pour autre facteur de virulence, sa capacité à former des biofilms résistants aux antimicrobiens.

La composition de la matrice du biofilm varie grandement en fonction de l'environnement et du substrat sur lequel elle est formée (**Gemba et al., 2022**). Les Salmonelles ont la capacité de former des biofilms considérables sur des surfaces plastiques (**Stepanovic et al., 2004**). Les constituants les plus importants de la matrice des biofilms de *Salmonella* sont les polysaccharides à l'exemple de la cellulose. Les protéines et les acides nucléiques sont présents en de plus faibles proportions dans la matrice extracellulaire (**Marshall et al., 2014**).

III.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus encore appelé Staphylocoque à coagulase positive est une cocobactérie anaérobie facultative (à l'exception de *S. aureus anaerobius*), Gram et catalase positive, dégradant le lactose, appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*, de 0,5 à 1,5 µm de diamètre. Elle est immobile, asporulée et généralement regroupée en diplocoques ou en amas en forme de grappe de raisin (figure 3) (**Agence de la santé publique du Canada, 2012 ; Archer et al., 2011**).

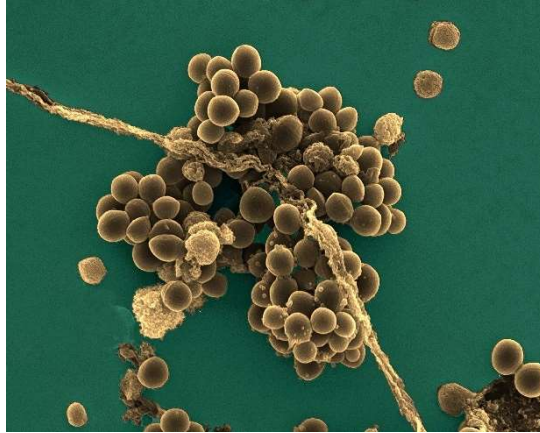


Figure 3 : Vue microscopique de *Staphylococcus aureus* (Institut Pasteur, 2018).

Les staphylocoques se développent dans les aliments et sont présents chez les animaux à des intervalles de température comprises entre 7°C et 48°C (avec l'optimum à 35°C), à une plage de pH idéale de 7 à 7,5, mais ils peuvent aussi se développer à pH bas (pH 4,5). *S. aureus* a la capacité de croître dans des milieux avec une faible activité de l'eau ($a_w = 0,8$) et est très tolérant aux sels et aux sucres (Karst, 2005). C'est une bactérie ubiquitaire pouvant être retrouvée dans différents réservoirs dans un état commensal ou pathogène. Son réservoir naturel est l'homme principalement sur la peau, les mains, les fosses nasales, la région périnéale des nouveaux nés et le tube digestif (OMS, 2020).

S. aureus est un pathogène opportuniste pouvant être responsable d'affection évoluant vers la guérison ou vers la mort (Agence de la santé publique du Canada, 2012 ; Archer *et al.*, 2011). *S. aureus* est une bactérie responsable de plusieurs maladies nosocomiales mais est également impliquée dans les cas de maladies d'origine alimentaire. L'affection induite est due à l'ingestion d'entérotoxines sécrétées par *S. aureus* dans l'aliment consommé (Karst, 2005). Les maladies alimentaires liées à ce germe sont très répandues et surviennent fréquemment (environ 30% de la population en seraient porteurs). Les symptômes apparaissent de façon soudaine voir 30 minutes après avoir consommé des aliments contaminés. Ils se manifestent par de fortes nausées, des crampes, des vomissements et quelquefois des diarrhées. L'état pathologique dans la grande partie des cas est de courte durée (un ou deux jours) (Agence de la santé publique du Canada, 2012). La dose infectieuse de ce microbe serait de 5 log ufc/g ou mL chez l'homme (Division de la sécurité alimentaire du Luxembourg, 2018 ; Karst, 2005).

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène et sa capacité à former des biofilms est un facteur de virulence important, déclenchant sa persistance dans des environnements

hostiles. Semblable à tout autre biofilm bactérien, celui de *S. aureus* a deux composants distincts, à savoir l'eau (environ 97%) et la matière organique qui comprend principalement les EPS et les micro-colonies (Hiltunen *et al.*, 2019). La matrice extracellulaire des biofilms staphylococciques comprend des exo-polysaccharides, un ADN protéique et extracellulaire (Idrees *et al.*, 2021). Les propriétés de résistance des biofilms aux antimicrobiens en font une réelle préoccupation afin d'assurer l'innocuité des surfaces et des aliments. De nombreux procédés de traitement pour faire face à ces derniers ont alors été développés tant qu'industriels que locaux.

IV. MOYENS DE LUTTE CONTRE LES BIOFILMS ET PRATIQUES DE NETTOYAGE DE RUE DES BPR

IV.1. Principaux moyens de lutte contre les biofilms

Les traitements utilisés pour éliminer les biofilms ont pour cibles les cellules microbiennes du biofilm ou le biofilm dans son entièreté (Boels & Blackman, 2016). Pour ce qui est de l'élimination des cellules du biofilm, l'usage d'antibiotiques et de désinfectants sont les principaux moyens utilisés. Les antibiotiques employés pour le traitement des biofilms sont sélectionnés en fonction de leur sensibilité et de leur capacité à pénétrer la matrice du biofilm (Roy *et al.*, 2018). Les bactéries du biofilm étant plus résistantes que celles sous la forme planctonique (Tremblay *et al.*, 2014), l'usage de thérapies combinant plusieurs antibiotiques est recommandé en comparaison aux monothérapies (Roy *et al.*, 2018). Les différents antibiotiques pourraient avoir chacun une cible pouvant être par exemple les cellules dormantes du biofilm ou celles en croissance.

En ce qui concerne l'élimination du biofilm en lui-même, de nombreux procédés enzymatiques existent. L'usage de ces derniers nécessite la maîtrise de la composition de la matrice des biofilms cibles sachant que celle-ci varie en fonction de la population microbienne qui la produit (Bridier *et al.*, 2011). Les traitements enzymatiques consistent à mettre le biofilm avec une solution de nettoyage contenant des enzymes et des désinfectants bactéricides. Les enzymes telles que les hydrolases, protéases ou laccases retrouvées dans certains détergents ont pour rôle d'éliminer la matrice protectrice, afin que le désinfectant puisse agir efficacement contre les cellules présentes dans le film (Boels & Blackman, 2016). Des stratégies de désinfection utilisant des détergents chimiques pour l'élimination des biofilms sont de moins en moins prescrites au regard de leur caractère toxique et de l'évolution du paysage règlementaire. C'est ainsi que les traitements aux biosurfactants émergent de plus en plus. Ces derniers sont des composés amphiphiles dotés de propriétés de surface telles que celles des

détergents et généralement produits par les bactéries, levures ou moisissures (**Mouafo et al., 2023**). Ils possèdent une activité antimicrobienne, antiadhésive et anti-biofilm. Il est à noter toutefois qu'aucun procédé de nettoyage actuel ne permet d'assurer l'élimination totale des biofilms formés sur des surfaces (**Boels & Blackman, 2016**). Des approches de prévention de la formation de biofilm ont alors été étudiées. La formation de biofilms se réalisant préférentiellement sur des supports hydrophobes, certaines approches de prévention préconisent l'usage de revêtements hydrophiles réduisant l'adhésion microbienne (**Cappello & Guglielmino, 2006 ; Boutaleb, 2007**). Des surfaces antimicrobiennes imprégnées d'antibiotiques, de désinfectants ou encore des nanoparticules telles que les nanoparticules d'argent ou d'antioxydants, peuvent également prévenir la formation de biofilms. Toutefois, ces derniers conduisent à une érosion rapide de ce type de surface ce qui ouvre des brèches permettant l'implantation de biofilms (**Obeizi & Benbouzid, 2020 ; Roy et al., 2018**).

IV.2. Pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques réutilisées (BPR)

Il existe de nombreux procédés de nettoyage des bouteilles qui varient en fonction de la matière dont sont faites ces dernières (verre, plastique, métal). Les BPR sont sujettes à diverses pratiques de nettoyage de rue appliquées par les acteurs de la vente des boissons de rue. Suivant une enquête menée auprès de ces derniers par **Mouafo et al. (2022)** dans la ville de Yaoundé et de la littérature, différents procédés de nettoyage ont été recensés. Ces procédés débutent après la collecte et le tri des bouteilles plastiques dans les poubelles ou d'autres sources d'approvisionnement. Il s'en suit un nettoyage superficiel qui consiste à laver l'extérieur de la bouteille, suivi d'un prérinçage avec soit de l'eau de robinet, de puits, de forage ou de source. Le lavage à l'eau est pour certains l'unique traitement appliqué et d'autres le poursuivent avec l'ajout de détergent (**Sun et al., 2017**). Le trempage dans une solution de détergent (liquide ou en poudre) peut se faire sur des durées données variant de 1 à 60 min. Un nettoyage interne des bouteilles est alors appliqué avec soit une brosse, une éponge, un arroseur ou soit par agitation manuelle. Les bouteilles sont rincées et désinfectées à l'eau de javel additionnée à de l'eau chaude ou non. La durée de désinfection varie de 1 à 60 min avec de l'eau froide, fraîche, tiède ou chaude. Les opérations qui suivent sont un rinçage et un séchage à la lumière du soleil ou à l'ombre, l'essuyage ou l'égouttage. La dernière étape des différents procédés de nettoyage est un conditionnement des bouteilles nettoyées dans des bassines, sacs ou seaux.

Bien que les bouteilles subissent des procédés de nettoyage, ceux-ci sont souvent corrélés à de nouvelles contaminations microbiennes (**Abrokwah et al., 2020**). Il ressort des travaux de **Sun et al. (2017)** portant sur les pratiques de nettoyage populaires et le niveau de

contamination des bouteilles, que les bouteilles qui n'étaient pas lavées étaient significativement moins chargées en coliformes que celles qui l'étaient fréquemment. De même, les travaux de **Mouafo *et al.* (2022)** ont montré que quel que soit le procédé de nettoyage de rue appliqué, les bouteilles plastiques analysées lavées et prêtes à être réutilisées contenaient encore toutes des biofilms. La persistance des biofilms après le traitement des bouteilles remet en cause l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue. La réutilisation des bouteilles plastiques dans ce cadre représente une menace pour la santé des populations. Il est donc nécessaire de trouver des procédés de nettoyage accessibles à moindre coût et à même d'éliminer les biofilms formés dans les bouteilles plastiques et ainsi préserver la santé des consommateurs.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

Le matériel était constitué de souches microbiennes, de milieux de culture, des boissons sucrées locales, des détergents, des supports de fixation et des équipements.

I.1. Souches microbiennes et milieux de culture

Ce travail a été réalisé avec comme souches microbiennes référencées cibles, *Salmonella Enteritidis* 155A et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Elles ont été mises à disposition par le laboratoire de microbiologie de l'Institut de Recherches Médicales et d'Etudes des Plantes Médicinales (IMPM).

Pour leur usage, deux milieux de culture ont été utilisés au cours de ce travail. Il s'agissait d'un bouillon nutritif et d'une gélose nutritive dont les compositions sont données en annexe. Le bouillon nutritif a servi de milieu de culture pour la revivification, le repiquage, la conservation et la croissance des souches pour la formation de biofilms. Il a également été utilisé pour l'évaluation des charges microbiennes et comme source de protéines pour la préparation de différentes solutions nutritives. La gélose nutritive quant à elle, a servi de milieu de purification des souches cibles avant leur conservation au frais. Il est à noter que les milieux cités ont été préparés selon les recommandations des fabricants.

I.2. Boissons sucrées locales et détergents achetés

Trois boissons sucrées locales vendues dans des bouteilles plastiques réutilisées ont été achetées chez différents vendeurs dans la rue au quartier Ngoa-ékélé (Yaoundé). Celles-ci ont été choisies sur la base de leur composition nutritionnelle et de leur pH. Il s'agissait d'un lait caillé, d'un jus d'*Hibiscus* sp (jus de foléré) et d'un jus d'*Adansonia digitata* (jus de baobab). Pour chaque boisson, deux bouteilles de 0,35 cL ont été achetées chez le même vendeur, puis les jus ont été reconstitués en une seule boisson pour un volume final de 0,7 cL.

Un détergent chimique (Madar) et un enzymatique (Bril) tous deux en poudre et de bas coût (50 Fcfa/25 g) ont été achetés dans une boutique locale de quartier. Un autre détergent enzymatique (Dash), cette fois sous forme liquide (7000 Fcfa/1,1 L) a été acquis auprès d'un supermarché. La composition de ces derniers est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Composition des détergents utilisés pour l'élimination des biofilms.

	Détergent chimique en poudre (Madar)	Détergent enzymatique en poudre (Bril)	Détergent enzymatique liquide (Dash)
Composition	Tensio-actifs anioniques ; tripolyphosphate de sodium ; percarbonate de sodium ; carbonate de sodium ; silicate de sodium ; carboxy méthylcellulose ; sulphate de sodium ; azurant optique ; parfums	Enzymes ; agents de surface ; tripolyphosphate de sodium ; Na ₂ CO ₃ ; azurants optiques ; parfum.	Enzymes ; agents de surface anioniques ; agent de surface non anioniques ; savon ; phosphonate ; parfums ; phenoxyethanol ; benzisothiazolinone ; methylisothiazolinone.
Concentration utilisée/recommandée par les fabricants	2,5 g/L	5 g/L	3 mL/L

I.3. Supports de fixation des biofilms

Des tubes Falcon de 50 mL qui sont de la même matière que les bouteilles plastiques (polyéthylène téréphtalate ou PET) ont servi de support de fixation des biofilms (figure 4).



Figure 4 : Aperçu des tubes Falcon en polyéthylène téréphtalate.

I.4. Réactifs et équipements utilisés

Comme réactifs, nous avons utilisés le glycérol, l'acide chlorhydrique (HCl) et l'hydroxyde de sodium (NaOH). Le sucre utilisé au cours de ce travail était du saccharose en poudre (99,9% de pureté).

Les principaux appareils ayant permis la réalisation de ce travail étaient :

- Un spectrophotomètre UVmini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japon) pour la mesure des densités optiques ;
- Un vortex TOP-MIX 94323 (Fisher Scientific Bioblock, Vaux milieu, France) avec une puissance maximale de 2400 trs/min ;
- Un pH-mètre 1100 Series (Oakton Inc, USA) ayant servi à la mesure ou l'ajustement des valeurs de pH des diverses solutions.



(a)



(b)



(c)

Figure 5 : Aperçu du spectrophotomètre (a), vortex (b) et pH-mètre (c) utilisés.

II. METHODES

Ce travail était subdivisé en trois grandes phases :

- Evaluation de l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques réutilisée (BPR) sur l'élimination des biofilms de *Salmonella Enteritidis* 155A et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
- Etude de la formation des biofilms des souches précédentes en simulant les conditions nutritionnelles des boissons sucrées commercialisées dans des BPR ;
- Détermination de l'influence des conditions de formation des biofilms de ces microorganismes sur l'efficacité des traitements.

II.1. Evaluation de l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques sur l'élimination des biofilms de *Salmonella Enteritidis* et de *Staphylococcus aureus*

Le travail mené au cours de cette phase a nécessité de faire l'inventaire des pratiques de nettoyage de rue de BPR, la production de biofilms ainsi que leur quantification avant et après application des précédentes pratiques de nettoyage.

II.1.1. Pratiques de nettoyage de rue des BPR testées

Partant des travaux d'enquête de **Mouafo et al. (2022)** portant sur le recensement des pratiques de nettoyage de rue de BPR dans la ville de Yaoundé, divers traitements ont été retenus pour ce travail. Il s'agissait d'un total de 22 traitements (tableau 2) dont 10 avec de l'eau froide, 10 autres semblables aux précédents à la différence qu'ils ont été faits avec de l'eau chaude et 02 traitements témoins. Le temps de contact des solutions testées aux supports à nettoyer était de 15 min, représentant la durée moyenne de lavage des BPR par les commerçants.

Tableau 2 : Traitements tests et témoins.

Type	Code	Nature du traitement	Code	Nature du traitement
Eau froide (25°C)	T1	Ef	T2	Ef + V
	T3	Ef + ½ C	T4	Ef + ½ E
	T5	Ef + C	T6	Ef + E
	T7	Ef + ½ C + V	T8	Ef + ½ E + V
	T9	Ef + C + V	T10	Ef + E + V
Eau chaude (80°C)	T11	Ec	T12	Ec + V
	T13	Ec + ½ C	T14	Ec + ½ E
	T15	Ec + C	T16	Ec + E
	T17	Ec + ½ C + V	T18	Ec + ½ E + V
	T19	Ec + C + V	T20	Ec + E + V
Témoins	Tt ₁	Ef + El + B	Tt ₂	Ec + V + Ef + El + B + V

Ef : eau froide ($T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$) ; **Ec** : eau chaude ($T = 80 \pm 2^\circ\text{C}$) ; **V** : vortex 5 min à 2400 trs/min ; **C** : détergent chimique à la concentration utilisée ($C=2,5 \text{ g/L}$) ; **E** : détergent enzymatique à la concentration recommandée par le fabricant ($C=5 \text{ g/L}$) ; **El** : détergent enzymatique liquide ($C=3 \text{ mL/L}$) ; **B** : brossage ; **Tt1 et Tt2** : traitements témoins.

II.1.2. Production de biofilms

Trois différents biofilms ont été formés dans des tubes Falcon, dont 02 monomicrobiens et 01 polymicrobien :

- Les deux premiers étaient des biofilms obtenus par culture de *S. Enteritidis* d'une part et *Staphylococcus aureus* d'autre part à une charge initialeensemencée de 6 log cell/mL dans des bouillons nutritifs stériles pour chaque souche ;
- Le troisième consistait à la formation de biofilms hétérogènes obtenus par simple incubation de bouillon nutritif non stérile.

L'incubation s'est faite à 37°C pendant 48h. Cette production de biofilms s'est faite en deux grandes phases :

❖ Préparation des cultures stocks

La production de biofilms monomicrobiens avait comme préalable la préparation des cultures stocks de chacune des souches cibles. Pour se faire, partant d'une culture stock de chaque souche d'étude, la pureté de celles-ci a été vérifiée par culture en stries sur gélose nutritive et incubation à 37°C pendant 24h. Après confirmation de la pureté sur la base de l'uniformité des colonies, une colonie a été prélevée et introduite dans 5 mL de bouillon nutritif (BN) puis incubée à 37°C pendant 24h. Par la suite, un double repiquage (par prélèvement de 1 mL de culture) a été réalisé dans 9 mL puis dans 30 mL avec 24h d'intervalle. Après culture, le stockage des souches s'est fait en mélangeant du glycérol stérile à chaque suspension microbienne dans un ratio 2/3 de culture et 1/3 de glycérol. Les mélanges ont été homogénéisés et distribués dans des cryotubes stériles (1 mL de mélange par cryotube) et conservés à -80°C . Il est à noter qu'avant d'être utilisées, les souches subissaient une revivification par triple repiquage sur 72h (1^{er} jour 100 μL dans 5 mL de BN ; 2^e jour 1 mL dans 9 mL de BN ; 3^e jour 1 mL dans 30 mL de BN).

❖ Préparation du bouillon nutritif et ensemencement

Pour la production des biofilms en eux-mêmes, le bouillon nutritif a été préparé selon les recommandations du fabricant puis distribué dans des tubes Falcon à raison de 15 mL par tube. Ces derniers ont été autoclavés à 121°C pendant 20 min (biofilms monomicrobiens) ou

non (biofilms hétérogènes). Pour chacune des souches, un ensemencement à une charge de 6 log cell/mL a été réalisé. Parmi les tubes contenant le bouillon nutritif stérile, 02 d'entre eux n'ont pas été ensemencés et ont servi de témoins pour l'évaluation de la formation de biofilms. Les tubes ensemencés et non ensemencés ont été incubés à 37°C pendant 48h.

II.1.3. Quantification des biofilms avant et après application des différentes pratiques de nettoyage de rue

Pour chaque pratique de nettoyage à tester, les biofilms formés dans 03 tubes ont été quantifiés puis traités. Le pourcentage de réduction a été obtenu en faisant la différence entre la moyenne des densités optiques des 03 répétitions avant et après traitement.

❖ Quantification des biofilms formés après culture microbienne

La quantité de biofilms formés après culture dans les conditions précédemment citées a été évaluée par la méthode décrite par **Djordjevic et al. (2002)**. Celle-ci consiste en la coloration des biofilms au cristal violet dilué à 1% et la mesure de l'absorbance du cristal violet retenu à l'aide d'une solution de décoloration. La coloration adsorbée est alors corrélée à la densité du biofilm formé.

Plus précisément, chaque tube Falcon sorti de l'incubateur a été lavé 5 fois à l'eau distillée pour éliminer les cellules planctoniques suivi d'un séchage à température ambiante pendant 45 min. Un volume de 15 mL de cristal violet (1%) y a ensuite été introduit suivi d'un repos pendant 45 min afin de colorer les biofilms formés. Ces tubes ont été rincés avec de l'eau distillée et 15 mL d'éthanol (95%) y ont été introduits pour les décolorer et solubiliser le cristal violet adsorbé. Les densités optiques des solutions éthanoliques obtenues ont été lues à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre avec de l'éthanol comme blanc (**Baomog et al., 2020**).

❖ Evaluation de la réduction de biofilms

Suite à la quantification des biofilms initialement formés, les tubes Falcon ont été traités avec les pratiques de nettoyage présentées au **II.1.1**. L'évaluation des biofilms résiduels s'est faite par le procédé de quantification décrit précédemment. Le pourcentage de réduction de biofilms (%Red) après traitement a été obtenue par la formule suivante :

$$\%Red = [(DO_i - DO_b) - (DO_f - DO_b) / (DO_i - DO_b)] * 100$$

DO_i : moyenne des densités optiques avant traitement ; **DO_f** : moyenne des densités optiques après traitement ; **DO_b** : densité optique du blanc (éthanol).

II.2. Etude de la formation des biofilms en simulant les conditions nutritionnelles des boissons sucrées vendues dans des BPR

Durant cette phase, le travail mené consistait à produire des biofilms monomicrobiens des deux souches en variant les conditions de croissance, à les quantifier après culture et à évaluer la charge microbienne des cellules planctoniques dans chaque condition.

II.2.1. Production de biofilms dans différentes conditions de croissance

❖ Plan expérimental d'évaluation de l'influence de quelques paramètres des boissons sucrées sur la formation de biofilms

L'étude de l'influence de quelques paramètres des boissons sucrées sur la croissance des biofilms a été faite en suivant un plan expérimental définissant les conditions de croissance dans les différents essais. Il s'agissait d'un plan composite central (CCD) à 4 facteurs (pH, %protéine, %sucre et temps d'incubation), chaque facteur ayant 5 niveaux. Le plan d'expérience codé (tableau 3) a été généré à partir du logiciel Statistica de STATSOFT. Il a ensuite été décodé en utilisant les valeurs réelles des différents niveaux (tableau 4).

Tableau 3 : Plan expérimental pour la formation des biofilms avec des valeurs codées.

Essais	pH	% Protéine	% Sucre	Temps
1	-1	-1	-1	1
2	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	-1	1	1	1
5	1	-1	-1	-1
6	1	-1	1	1
7	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1
9	0	0	0	0
10	-1	-1	-1	-1
11	-1	-1	1	1
12	-1	1	-1	1
13	-1	1	1	-1
14	1	-1	-1	1
15	1	-1	1	-1
16	1	1	-1	-1
17	1	1	1	1
18	0	0	0	0
19	-2	0	0	0
20	2	0	0	0
21	0	-2	0	0
22	0	2	0	0

23	0	0	-2	0
24	0	0	2	0
25	0	0	0	-2
26	0	0	0	2
27	0	0	0	0

Les teneurs en sucre (5 à 25%), en protéine (0 à 5%) ainsi que le pH (3 à 7) ont été choisis sur la base de la littérature pour être représentatifs des différentes boissons sucrées locales généralement consommées par les populations. Pour ce qui est des valeurs du temps d'incubation (12 à 60 h), elles simulaient la durée moyenne probable entre la consommation de la boisson sucrée et le recyclage des bouteilles plastiques par les vendeurs.

Tableau 4 : Valeurs réelles des niveaux des facteurs.

Facteurs	-2	-1	0	1	2
pH	3	4	5	6	7
%Protéine	0	1,25	2,5	3,75	5
%Sucre	5	10	15	20	25
Temps d'incubation (h)	12	24	36	48	60

Le tableau 5 présente le plan expérimental avec les valeurs réelles des facteurs d'étude.

Tableau 5 : Plan expérimental décodé avec les valeurs réelles des niveaux des facteurs.

Essai	pH	%Protéine	%Sucre	Temps (h)
1	4	1,25	10	48
2	4	1,25	20	24
3	4	3,75	10	24
4	4	3,75	20	48
5	6	1,25	10	24
6	6	1,25	20	48
7	6	3,75	10	48
8	6	3,75	20	24
9	5	2,5	15	36
10	4	1,25	10	24
11	4	1,25	20	48
12	4	3,75	10	48
13	4	3,75	20	24
14	6	1,25	10	48
15	6	1,25	20	24
16	6	3,75	10	24
17	6	3,75	20	48
18	5	2,5	15	36
19	3	2,5	15	36
20	7	2,5	15	36

21	5	0	15	36
22	5	5	15	36
23	5	2,5	5	36
24	5	2,5	25	36
25	5	2,5	15	12
26	5	2,5	15	60
27	5	2,5	15	36

❖ Préparation des solutions nutritives

La préparation des différentes solutions nutritives suivant le plan expérimental s'est faite à partir d'eau distillée, du sucre blanc (saccharose) et de la poudre de bouillon nutritif (source de protéine). Le pH a été ajusté avec de l'acide chlorhydrique (HCl) et de l'hydroxyde de sodium (NaOH). Les solutions ainsi obtenues ont été distribuées dans 4 tubes Falcon par solution à raison de 15 mL par tube puis autoclavées à 121°C pendant 20 min.

❖ Ensemencement

Pour chaque souche, une charge de 6 log cell/mL a étéensemencée dans les différents milieux stériles et incubés à 37°C selon le temps de conservation à la condition testée. Des quatre tubes utilisés par condition, trois d'entre eux ont étéensemencés et l'autre servant de contrôle négatif. Ce dernier a servi de témoin pour l'évaluation de la formation du biofilm.

II.2.2. Evaluation de la charge microbienne après culture et quantification des biofilms formés

❖ Evaluation de la charge microbienne

Une évaluation de la concentration cellulaire a été faite par la méthode du nombre le plus probable (NPP). Elle consiste à ensemencer des dilutions successives d'un même échantillon dans des tubes de milieu de culture de façon répétée, puis à confirmer la présence de croissance microbienne par des troubles après incubation (05 dilutions par échantillon ont étéensemencées de façon répétée dans 03 tubes chacune au cours de cette étude). Le nombre de tube présentant des troubles par dilution ensemencée renseigne de façon estimative sur la charge de la solution de départ. Les charges ont été estimées avec l'outil Excel MPN ver2 2010, celui-ci suivant le principe de la table de Mac Grady.

Il s'agissait ici de voir s'il existe un lien de proportionnalité entre la charge microbienne dans le milieu et la quantité de biofilms formés. La charge des cellules planctoniques a été évaluée dans les 03 tubes ensemencés par condition.

❖ Quantification des biofilms formés dans différentes conditions

Pour chaque condition du plan expérimental, l'évaluation de la quantité de biofilms formés après incubation s'est faite suivant la même approche décrite à la phase 1 du travail. Les densités optiques (DO) des solutions éthanoliques issues des différentes conditions ont été mesurées et le pourcentage de formation de biofilms (%FB) a été obtenu à partir de la formule suivante :

$$\%FB = [(DO_e - DO_t) / DO_t] * 100$$

DO_e = Moyenne des densités optiques des tubesensemencés ; DO_t = Densité optique du tube témoin nonensemencé.

II.3. Détermination de l'influence des conditions de formation des biofilms des souches cibles sur l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue des BPR

La réalisation de cette phase du travail s'est faite avec comme pratiques de nettoyage de rue, celles avec de l'eau uniquement et eau (froide et chaude) + détergent à la moitié de la concentration recommandée vu qu'ils sont les plus communs. En effet, très peu de commerçants respecteraient les proportions recommandées par les fabricants. Quant aux conditions de croissance, les essais où il y'avait le plus formation de biofilms aux différents pH étudiés précédemment ont été sélectionnés pour chaque souche.

II.3.1. Production de biofilms dans différentes conditions de croissance sélectionnées

Pour chaque microorganisme, la production de biofilm durant cette étape a été réalisée en l'ensemencant à une charge de 6 log cell/mL dans les solutions nutritives des conditions du plan expérimental retenues. Ces solutions ont préalablement été préparées, distribuées dans les tubes Falcon et stérilisées tel que décrit précédemment. Indépendamment du plan expérimental, la durée d'incubation de toutes les cultures était de 48h à 37°C.

II.3.2. Quantification des biofilms avant et après application des différentes pratiques de nettoyage de rue des BPR

L'influence des pratiques de nettoyage de rue sur l'élimination des biofilms produits dans les conditions sélectionnées précédentes a été évaluée comme décrite à la phase 1 de ce travail. En effet, les biofilms formés dans les tubes Falcon après incubation ont été quantifiés selon le procédé décrit par **Djordjevic *et al.* (2002)**. Les tubes ont ensuite été lavés avec les

pratiques de nettoyage retenues et les biofilms résiduels ont été quantifiés. Le pourcentage de réduction des biofilms (%Red) dans chaque condition a ainsi pu être évalué.

II.3.3. Validation des résultats

Afin de vérifier que les résultats obtenus en laboratoire prévalent tout aussi en conditions réelles, trois boissons sucrées vendues dans les BPR ont été achetées dans la rue pour servir de milieux de formation des biofilms. Il s'agissait d'un lait fermenté, d'un jus d'*Hibiscus* sp (jus de foléré) et d'un jus d'*Adansonia digitata* (jus de baobab).

❖ Présentation des boissons sucrées achetées

Le tableau 6 présente les caractéristiques des boissons achetées dans la rue. Les teneurs en sucre et en protéine des boissons ont pu être obtenues sur la base des procédés de production recueillis auprès des vendeurs. Leur pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

Tableau 6 : Paramètres des boissons sucrées achetées dans la rue avant ensemencement.

Boissons	pH	%Protéine	%Sucre
Lait caillé	6,38	4	15,65
Jus d'hibiscus	5,20	1,26	16,66
Jus de baobab	6,00	0,25	10

❖ Production de biofilms à partir des boissons sucrées de rue vendues dans les BPR

Pour chaque boisson, 03 approches de formation de biofilms ont été utilisées. Elles ont été faites par incubation à 37°C pendant 48h de 15 mL de :

- La boisson nonensemencée ;
- La boissonensemencée à 6 log cell/mL de *Salmonella Enteritidis* et ;
- La boissonensemencée à 6 log cell/mL de *Staphylococcus aureus* ;

Les cultures ont été réalisées en triplicate dans les tubes Falcon pour chaque pratique de nettoyage appliquée.

❖ Evaluation de la charge microbienne après incubation

La croissance des germes étudiés dans les différentes boissons par comparaison aux témoins nonensemencés a été évaluée par la méthode du NPP. Ceci visait à savoir si on pouvait imputer à ces germes une éventuelle formation de biofilms dans ces matrices.

❖ **Pratiques de nettoyage**

Les pratiques eau froide + détergent (chimique ou enzymatique) à la moitié de la concentration recommandée ont été retenues. En effet, ces traitements sont généralement les plus appliqués dans la rue, les commerçants respectant peu les proportions d'usage recommandées par les fabricants.

❖ **Quantification des biofilms avant et après application des pratiques de nettoyage de rue des BPR**

Les biofilms formés après incubation et ceux résiduels après traitement ont été quantifiés comme en conditions expérimentales par la méthode décrite par **Djordjevic *et al.* (2002)**.

II.4. Analyses statistiques

Les expériences ont été réalisées en triplicate et les résultats exprimés en moyenne \pm écart-type pour les pourcentages de réduction des biofilms. Des tests ANOVA Post-hoc Tukey HSD (high square difference) ont été faits pour évaluer la significativité des différences observées entre les effets des pratiques de nettoyage sur l'élimination des biofilms formés ($p < 0,05$).

Le test de Student a été réalisé pour évaluer le niveau de corrélation entre la charge microbienne des cellules planctoniques dans les différentes conditions du plan expérimental et le pourcentage de formation de biofilm associé.

La modélisation de l'influence des paramètres étudiés sur la formation de biofilm a été faite par analyse de régression multiple (GRM).

Toutes ces analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Statistica de STATSOFT.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS

I.1. Efficacité des pratiques de nettoyage de rue des BPR sur l'élimination des biofilms microbiens

I.1.1. Réduction des biofilms formés à partir du bouillon non stérile

Le tableau 7 présente les pourcentages de réduction obtenus après culture et traitement des biofilms formés à partir du bouillon nutritif non stérile.

Tableau 7 : Pourcentage de réduction après traitement des biofilms formés par la flore du bouillon non stérile.

	Traitements		%Réduction de biofilms (moyenne ± écart-type)	Traitements		%Réduction de biofilms (moyenne ± écart-type)
Eau froide (25°C)	T1	Ef	4,09 ± 5,45 ^a	T2	Ef + V	0,12 ± 0,16 ^a
	T3	Ef + ½ C	9,3 ± 5,96 ^{ab}	T4	Ef + ½ E	34,01 ± 4,2 ^{bcdef}
	T5	Ef + C	30,97 ± 5,54 ^{bcde}	T6	Ef + E	41,76 ± 5,45 ^{cdef}
	T7	Ef + ½ C + V	42,46 ± 4,8 ^{def}	T8	Ef + ½ E + V	53,29 ± 2,01 ^{ef}
	T9	Ef + C + V	42,7 ± 5,09 ^{def}	T10	Ef + E + V	57,49 ± 5,49 ^f
Eau chaude (80°C)	T11	Ec	1,53 ± 2,04 ^a	T12	Ec + V	15,34 ± 5,52 ^{abc}
	T13	Ec + ½ C	34,77 ± 10,06 ^{bcdef}	T14	Ec + ½ E	21,02 ± 3,73 ^{abcd}
	T15	Ec + C	42,46 ± 5,68 ^{def}	T16	Ec + E	32,88 ± 14,23 ^{bcdef}
	T17	Ec + ½ C + V	45,23 ± 5,26 ^{def}	T18	Ec + ½ E + V	26,14 ± 8,64 ^{abcd}
	T19	Ec + C + V	41,06 ± 11,5 ^{cdef}	T20	Ec + E + V	40,23 ± 1,42 ^{cdef}
Témoin	Tt1	Ef + El + B	44,12 ± 0,46 ^{cdef}	Tt2	Ec + V + Ef + El + B + V	41,65 ± 0,92 ^{cdef}

Dans l'ensemble du tableau les valeurs qui ne sont pas suivies par la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Ef : eau froide ($T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$) ; **Ec :** eau chaude ($T = 80 \pm 2^\circ\text{C}$) ; **V :** vortex 5 min à 2400 trs/min ; **C :** détergent chimique à la concentration utilisée ($C=2,5 \text{ g/L}$) ; **E :** détergent enzymatique à la concentration recommandée par le fabricant ($C=5 \text{ g/L}$) ; **El :** détergent enzymatique liquide ($C=3 \text{ mL/L}$) ; **B :** brossage ; **Tt1 et Tt2 :** traitements témoins.

Il ressort de ce tableau qu'en fonction du traitement appliqué, les moyennes des pourcentages de réduction variaient entre 0,12 et 57,49%. On peut noter globalement que les traitements avec détergent étaient significativement plus efficaces que ceux en absence. Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements avec détergent chimique et enzymatique. Contrairement aux détergents chimiques, le détergent enzymatique avait tendance à être moins efficace avec de l'eau chaude (80°C) par comparaison à l'eau froide. Cela pourrait

s'apprécier en comparant le traitement T8 (eau froide + ½ détergent enzymatique + vortex) et T18 (eau chaude + ½ détergent enzymatique + vortex) qui ont respectivement des pourcentages de réduction de 53,29 et 26,14%. Les traitements faits avec le vortex avaient tendance à avoir des niveaux de réduction plus élevés que ceux en absence bien que des différences significatives ne soient pas toujours relevées. Les niveaux de réduction observés avec les traitements témoins étaient statistiquement similaires au traitement test le plus efficace T10 (eau froide + détergent enzymatique à la concentration recommandée + vortex).

I.1.2. Réduction des biofilms formés par *Salmonella Enteritidis*

Les traitements appliqués sur les biofilms de *S. Enteritidis* ont eu des niveaux d'efficacité variables. Les moyennes des pourcentages de réduction de ces biofilms en fonction des pratiques de nettoyage sont présentées dans le tableau 8 ci-après.

Tableau 8 : Pourcentage de réduction après traitement des biofilms formés par *Salmonella Enteritidis*.

	Traitements		%Réduction de biofilm (moyenne ± écart-type)	Traitements		%Réduction de biofilm (moyenne ± écart-type)
Eau froide (25°C)	T1	Ef	0 ± 0 ^a	T2	Ef + V	0,83 ± 1,1 ^{ab}
	T3	Ef + ½ C	0 ± 0 ^a	T4	Ef + ½ E	0 ± 0 ^a
	T5	Ef + C	2,28 ± 2,48 ^{ab}	T6	Ef + E	0 ± 0 ^a
	T7	Ef + ½ C + V	0 ± 0 ^a	T8	Ef + ½ E + V	0,84 ± 1,12 ^{ab}
	T9	Ef + C + V	10,86 ± 9,07 ^{ab}	T10	Ef + E + V	5,66 ± 0,94 ^{ab}
Eau chaude (80°C)	T11	Ec	0,63 ± 0,84 ^{ab}	T12	Ec + V	0 ± 0 ^a
	T13	Ec + ½ C	0 ± 0 ^a	T14	Ec + ½ E	7,19 ± 4,8 ^{ab}
	T15	Ec + C	1,94 ± 2,58 ^{ab}	T16	Ec + E	0 ± 0 ^a
	T17	Ec + ½ C + V	0 ± 0 ^a	T18	Ec + ½ E + V	2,87 ± 3,83 ^{ab}
	T19	Ec + C + V	6,62 ± 8,83 ^{ab}	T20	Ec + E + V	0 ± 0 ^a
Témoin	Tt1	Ef + El + B	0 ± 0 ^a	Tt2	Ec + V + Ef + El + B + V	18,56 ± 13,8 ^b

Dans l'ensemble du tableau les valeurs qui ne sont pas suivies par la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Ef : eau froide ($T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$) ; **Ec :** eau chaude ($T = 80 \pm 2^\circ\text{C}$) ; **V :** vortex 5 min à 2400 trs/min ; **C :** détergent chimique à la concentration utilisée ($C=2,5 \text{ g/L}$) ; **E :** détergent enzymatique à la concentration recommandée par le fabricant ($C=5 \text{ g/L}$) ; **El :** détergent enzymatique liquide ($C=3 \text{ mL/L}$) ; **B :** brossage ; **Tt1 et Tt2 :** traitements témoins.

Il découle de ce tableau que les différents traitements tests appliqués n'ont pas été capables d'éliminer les biofilms de *S. Enteritidis* avec des pourcentages de réduction inférieurs à 11%. Toutefois, le traitement témoin Tt₂ avec 18,56% de réduction a été le plus efficace contre ces biofilms. Le traitement témoin Tt₁ qui avait moins d'agents de nettoyage n'a montré aucune élimination.

I.1.3. Réduction des biofilms formés par *Staphylococcus aureus*

Le tableau 9 présente le pourcentage de réduction après traitement des biofilms formés par *Staphylococcus aureus*. De ce dernier, il se dégage que le pourcentage de réduction des biofilms ne varie pas significativement d'un traitement à un autre. Le traitement test T20 (eau chaude + détergent enzymatique à la concentration recommandée + vortex) a été le plus efficace avec 55,79% d'élimination. Le traitement Tt₁ témoin (eau froide + détergent enzymatique liquide à la concentration recommandée + brossage) s'est toutefois montré le plus efficace avec 61,31% de pourcentage de réduction.

Tableau 9 : Pourcentage de réduction après traitement des biofilms formés par *Staphylococcus aureus*.

	Traitements		%Réduction de biofilm (moyenne ± écart-type)	Traitements		%Réduction de biofilm (moyenne ± écart-type)
Eau froide	T1	Ef	36,31 ± 6,69 ^a	T2	Ef + V	41,58 ± 3,94 ^a
	T3	Ef + ½ C	29,09 ± 7,35 ^a	T4	Ef + ½ E	39,09 ± 5 ^a
	T5	Ef + C	30,7 ± 18,76 ^a	T6	Ef + E	39,98 ± 1,07 ^a
	T7	Ef + ½ C + V	33,41 ± 15,24 ^a	T8	Ef + ½ E + V	45,27 ± 11,78 ^a
	T9	Ef + C + V	38,26 ± 5,46 ^a	T10	Ef + E + V	46,27 ± 3,65 ^a
Eau chaude	T11	Ec	16,49 ± 7,65 ^a	T12	Ec + V	25,36 ± 7,19 ^a
	T13	Ec + ½ C	33,07 ± 11,67 ^a	T14	Ec + ½ E	35,54 ± 6,43 ^a
	T15	Ec + C	32,42 ± 6,48 ^a	T16	Ec + E	41,74 ± 8,48 ^a
	T17	Ec + ½ C + V	29,07 ± 16,64 ^a	T18	Ec + ½ E + V	30,63 ± 11,34 ^a
	T19	Ec + C + V	32,42 ± 5,89 ^a	T20	Ec + E + V	55,79 ± 4,17 ^a
Témoin	Tt₁	Ef + El + B	61,31 ± 3,36 ^a	Tt₂	Ec + V + Ef + El + B + V	37,62 ± 8,89 ^a

Dans l'ensemble du tableau les valeurs qui ne sont pas suivies par la même lettre sont significativement différentes (p < 0,05).

Ef : eau froide (T = 25 ± 2°C) ; **Ec :** eau chaude (T = 80 ± 2°C) ; **V :** vortex 5 min à 2400 trs/min ; **C :** détergent chimique à la concentration utilisée (C=2,5 g/L) ; **E :** détergent enzymatique à la concentration recommandée par le fabricant (C=5 g/L) ; **El :** détergent enzymatique liquide (C=3 mL/L) ; **B :** brossage ; **Tt₁ et Tt₂ :** traitements témoins.

I.2. Formation des biofilms par les souches ciblées en simulant les conditions nutritionnelles des boissons sucrées commercialisées dans des BPR

I.2.1. Influence des facteurs sélectionnés sur la formation des biofilms

Les pourcentages de formation des biofilms des deux souches d'étude dans les différentes conditions du plan expérimental et les charges en cellules planctoniques y estimées sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Pourcentage de formation des biofilms et charges en cellules planctoniques de *Staphylococcus aureus* et de *Salmonella Enteritidis* en fonction des conditions de croissance.

Essai	pH	%Protéine	%Sucre	Temps (h)	<i>S. aureus</i>		<i>S. Enteritidis</i>	
					%FB	CC (log cell/mL)	%FB	CC (log cell/mL)
1	4	1,25	10	48	5,83	4,3	4,95	7,5
2	4	1,25	20	24	1,37	4,8	1,80	5,3
3	4	3,75	10	24	0	5,75	6,61	5,36
4	4	3,75	20	48	1,54	2,75	1,52	4,6
5	6	1,25	10	24	39,63	11,63	5,00	8,7
6	6	1,25	20	48	91,84	12,5	24,97	9,66
7	6	3,75	10	48	105,64	11,45	107,41	10,63
8	6	3,75	20	24	59,50	11,32	0,26	8,7
9	5	2,5	15	36	0	8,2	0	8,84
10	4	1,25	10	24	5,88	2,9	2,2	6,8
11	4	1,25	20	48	8,97	5,35	11,53	6,93
12	4	3,75	10	48	2,22	4,9	0	5,25
13	4	3,75	20	24	0	4,6	0	5,55
14	6	1,25	10	48	110,48	11,2	5,10	9,26
15	6	1,25	20	24	23,51	11,34	2,69	8,6
16	6	3,75	10	24	101,71	12,37	3,10	9,97
17	6	3,75	20	48	64,22	10,76	4,07	10,53
18	5	2,5	15	36	0	7	1,78	10,46
19	3	2,5	15	36	0	2,85	0	8,38
20	7	2,5	15	36	65,62	10,67	135,95	11,18
21	5	0	15	36	0	6,85	26,91	8,57
22	5	5	15	36	0	7,9	0	10,06
23	5	2,5	5	36	112,11	11,3	15,14	9,16
24	5	2,5	25	36	0,31	6,7	3,66	9,64
25	5	2,5	15	12	0	6,1	8,68	9,25
26	5	2,5	15	60	12,51	11,03	0	8,94
27	5	2,5	15	36	10,33	8,25	3,01	9,16

%FB : pourcentage de formation des biofilms ; CC : concentration cellulaire en cellules planctoniques.

Des résultats obtenus, il s'avère que :

- La variation des conditions de croissance influence la quantité de biofilms formés. La souche de *S. aureus* a tendance à former plus de biofilms que *S. Enteritidis* dans les différents essais. La condition 23 (pH= 5 ; %protéine= 2,5 ; %sucre= 5 ; temps= 36h) du plan expérimental est celle où le pourcentage de formation des biofilms de *S. aureus* a été le plus élevé avec 112,11%. Quant à *S. Enteritidis*, c'est plutôt la condition 20 (pH= 7 ; %protéine= 2,5 ; %sucre= 15 ; temps= 36h) qui s'est montrée la plus favorable (135,95%).
- La croissance des cellules planctoniques des deux souches d'étude varie en fonction des conditions de croissance testées. La souche de *S. Enteritidis* a tendance à mieux se développer à pH acide contrairement à *S. aureus*. La condition 20 (pH= 7 ; %protéine= 2,5 ; %sucre= 15 ; temps= 36h) est celle où *S. Enteritidis* a eu la charge la plus élevée, soit 11,18 log cell/mL. Pour ce qui est de *S. aureus*, sa croissance a été meilleure dans la condition 6 (pH= 6 ; %protéine= 1,25 ; %sucre= 20 ; temps= 48h) avec une charge de 12,37 log cell/mL.
- Une corrélation linéaire établie par le test de Student a montré pour les 02 souches d'étude que la concentration cellulaire des cellules planctoniques influence significativement ($p < 0,05$) la quantité de biofilms formés. Toutefois, les coefficients de détermination R^2 de *S. Enteritidis* et de *S. aureus* étaient relativement bas et respectivement de 0,17 et 0,59.

I.2.2. Modélisation de la formation des biofilms en fonction des facteurs d'étude

Des analyses par régression multiple des données du plan expérimental ont été réalisées dans le but de prédire la formation de biofilms des souches cibles en fonction des conditions testées. La meilleure équation trouvée décrivant la formation des biofilms de *Staphylococcus aureus* est présentée ci-dessous avec une R^2 de **0,767**. Dans cette équation tous les facteurs étaient statistiquement significatifs ($p \leq 0,05$).

$$\%FB = 90,1633 - 18,1792\%suc + 0,5104\%suc^2 + 4,9798pH*\%pro + 0,461pH*tps - 0,6489\%pro*tps$$

Avec %suc : teneur en sucre effet linéaire ; %suc² : teneur en sucre effet quadratique ; pH : potentiel hydrogène ; %pro : teneur en protéine ; tps : temps d'incubation.

La teneur en sucre (linéaire) avec le coefficient le plus élevé (-18,1792) est le facteur influençant le plus la formation des biofilms de *S. aureus*. L'augmentation de celle-ci réduit la formation des biofilms. Un léger effet quadratique a également été noté. La figure 6 illustre cet

effet de la teneur en sucre à 2,5% de protéine et 36h de temps d'incubation. On peut clairement voir l'effet négatif du pourcentage en sucre en deçà de 15% et une autre tendance au-delà.

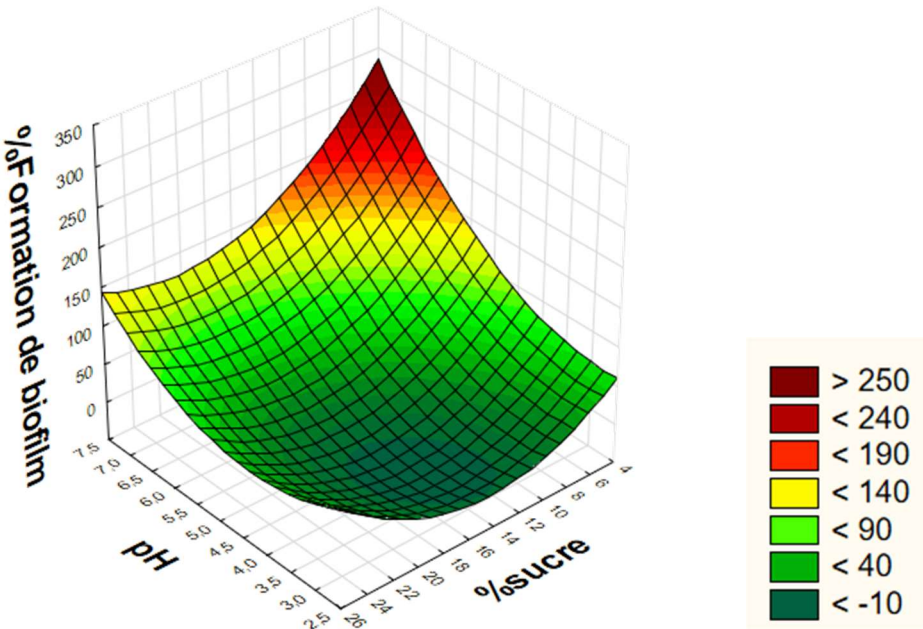


Figure 6 : Effet du pH et du sucre sur la formation des biofilms de *Staphylococcus aureus* à 2,5% de protéine et 36h d'incubation.

Bien que moins importante, une interaction significative positive pour la formation des biofilms de *S. aureus* a été observée entre le pH et la teneur en protéine avec un coefficient de 4,9798. La figure 7 montre clairement cette formation des biofilms de *S. aureus* comme fonction de ces 02 paramètres. A pH acide, l'augmentation de la teneur en protéine réduit la formation des biofilms, l'effet inverse est observé lorsque le pH tend vers le neutre.

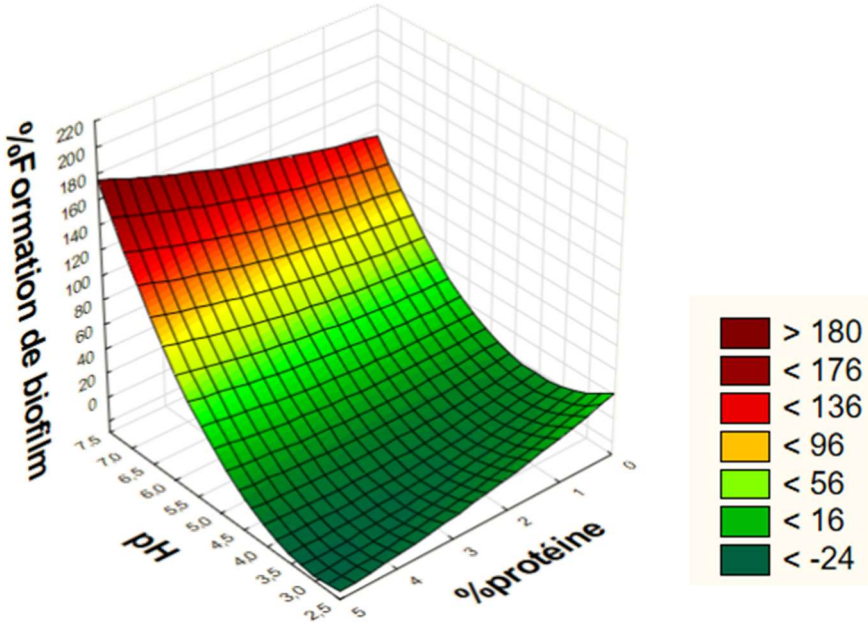


Figure 7 : Effet du pH et des protéines sur la formation des biofilms de *Staphylococcus aureus* à 15% de sucre et 36h d'incubation.

Concernant la formation des biofilms par *Salmonella Enteritidis*, l'équation ci-après avec une R^2 de **0,569** a permis de décrire cette dernière. Dans cette équation tous les facteurs étaient statistiquement significatifs ($p \leq 0,05$).

$$\%FB = 309,965 - 136,545pH + 14,643pH^2 + 0,073pH*\%pro*tps - 0,019\%pro*\%suc*tps$$

Avec **pH** : pH effet linéaire ; **pH²** : pH effet quadratique ; **%suc** : teneur en sucre ; **%pro** : teneur en protéine ; **tps** : temps d'incubation.

Cette équation montre que le pH des solutions est le paramètre qui a la plus grande influence sur la formation des biofilms de *S. Enteritidis* avec un effet linéaire (-136,545) et un effet quadratique (14,643). L'augmentation de ce dernier a tendance à réduire la quantité de biofilms formés jusqu'à un certain seuil au-delà duquel l'inverse se produit (figure 8). Il est également observé que la teneur en sucre, en protéine et le temps d'incubation ont une faible influence (0,019) sur la quantité de biofilms formés (figure 9).

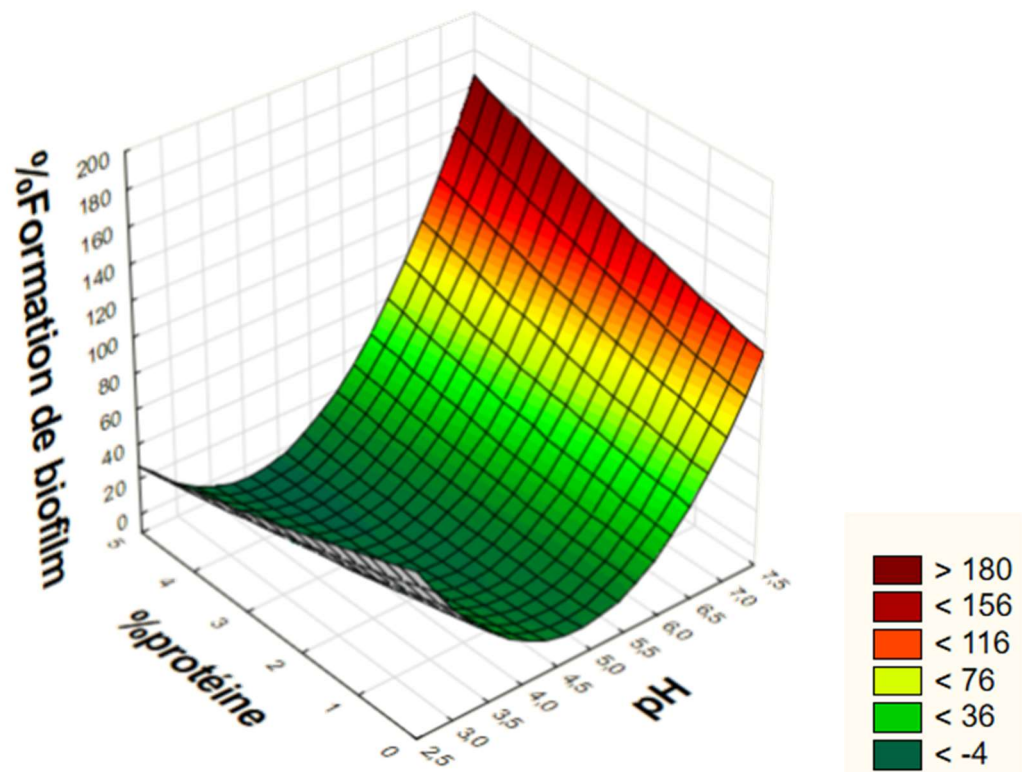


Figure 8 : Effet du pH et des protéines sur la formation des biofilms de *Salmonella Enteritidis* à 15% de sucre et 36h d'incubation

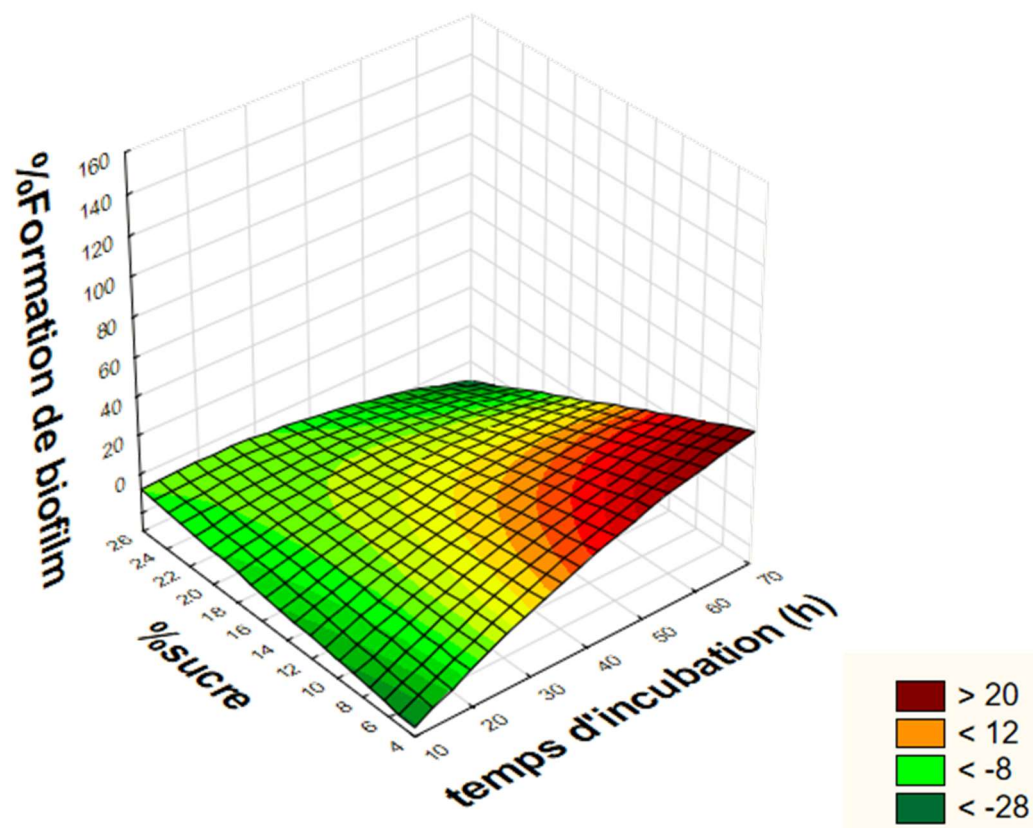


Figure 9 : Effet de la teneur en sucre et du temps d'incubation sur la formation des biofilms de *Salmonella Enteritidis* à pH 5 et 2,5% de protéine.

I.3. Influence des conditions de formation des biofilms des souches cibles sur l'efficacité des traitements

Au terme de la phase 2 du travail, les conditions où la formation de biofilms a été la plus élevée à chaque valeur de pH ont été retenues. Il s'agissait précisément pour *S. Enteritidis* de E6, E7, E11, E20 et E21 et pour *S. aureus* de E7, E11, E14, E20 et E23.

I.3.1. Influence des conditions de formation des biofilms de *Salmonella Enteritidis* sur l'efficacité des traitements

Le tableau 11 présente la variation de l'efficacité des traitements sélectionnés sur les biofilms de *Salmonella Enteritidis* formés dans les conditions de pH, %protéine et %sucre des essais 6, 7, 11, 20 et 21 du plan expérimental.

Tableau 11 : Pourcentage de réduction des biofilms *Salmonella Enteritidis* en fonction des conditions de croissance et des traitements appliqués.

Traitements	%Réduction des biofilms de <i>S. Enteritidis</i> (moyenne ± écart-type)				
	E6 (pH 6 ; %pro 1,25 ; %suc 20)	E7 (pH 6 ; %pro 3,75 ; %suc 10)	E11 (pH 4 ; %pro 1,25 ; %suc 20)	E20 (pH 7 ; %pro 2,5 ; %suc 15)	E21 (pH 5 ; %pro 0 ; %suc 15)
T1 (Ef)	^{ab} 15,23 ± 5,89 ^a	^a 8,05 ± 10,73 ^a	^a 5,24 ± 5,15 ^a	^a 1,94 ± 2,59 ^a	^{ab} 8,22 ± 2,75 ^a
T11 (Ec)	^{ab} 14,99 ± 5,33 ^a	^a 20,54 ± 20,26 ^a	^a 4,95 ± 3,03 ^a	^{bc} 24,71 ± 3,66 ^a	^{bc} 24,44 ± 3,75 ^a
T3 (Ef + ½C)	^a 0 ± 0 ^a	^a 10,25 ± 2,83 ^a	^a 12,08 ± 10,95 ^a	^{ab} 14,13 ± 6,32 ^a	^a 1,10 ± 1,12 ^a
T13 (Ec + ½C)	^a 0 ± 0 ^a	^a 25,80 ± 3,13 ^b	^a 9,85 ± 6,83 ^{ab}	^{bc} 25,85 ± 1,41 ^b	^{ab} 7,95 ± 10,24 ^{ab}
T4 (Ef + ½E)	^{ab} 14,17 ± 2,92 ^a	^a 15,12 ± 5,07 ^a	^{ab} 22,94 ± 7,23 ^a	^{abc} 17,31 ± 6,09 ^a	^{abc} 21,99 ± 6,15 ^a
T14 (Ec + ½E)	^b 20,32 ± 1,7 ^b	^a 22,84 ± 7,26 ^b	^a 12,50 ± 4,25 ^{ab}	^a 1,01 ± 1,35 ^a	^{ab} 5,31 ± 7,08 ^{ab}
Tt₁ (Ef+EI+B)	^c 46,47 ± 6,06 ^{ab}	^a 38,07 ± 4,96 ^{ab}	^b 44,83 ± 6,34 ^{ab}	^c 33,42 ± 5,89 ^a	^d 54,32 ± 3,86 ^b
Tt₂ (Ec+V+Ef+EI+ B+V)	^c 42,14 ± 8,09 ^a	^a 39,64 ± 4,27 ^a	^b 42,69 ± 6,24 ^a	^c 32,99 ± 6,51 ^a	^{cd} 43,39 ± 7,27 ^a

Au sein de la même colonne, les valeurs précédées des lettres différentes sont significativement différentes. Au sein de la même ligne, celles suivies des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

T1 (eau froide) ; **T11** (eau chaude) ; **T3** (eau froide + ½ détergent chimique) ; **T13** (eau chaude + ½ détergent chimique) ; **T4** (eau froide + ½ détergent enzymatique) ; **T14** (eau chaude + ½ détergent enzymatique) ; **Tt₁** témoin (eau froide + détergent enzymatique liquide + brossage) ; **Tt₂** témoin (eau chaude + vortex + eau froide + détergent enzymatique liquide + brossage + vortex) ; **%pro** (%protéine) ; **%suc** (%sucre).

Les résultats ici présentés montrent que les traitements T13, T14 et le traitement témoin Tt₁ avaient des niveaux de réduction des biofilms variables d'une condition à l'autre. Bien qu'il ne soit pas statistiquement différent des autres traitements tests, le niveau de réduction le plus élevé des traitements tests (25,85%) a été obtenu par application du traitement T13 sur les biofilms formés dans la condition E20. Les traitements témoins avec le pourcentage de réduction le plus élevé (54,32%) ont été statistiquement plus efficaces que les traitements tests dans toutes les conditions de formation de biofilm excepté dans la condition E7 où une différence significative n'est pas observée.

I.3.2. Influence des conditions de formation des biofilms de *Staphylococcus aureus* sur l'efficacité des traitements

Le tableau 12 présente la variation de l'efficacité des traitements sur les biofilms formés par *S. aureus* dans les conditions de pH, %protéine et %sucre des essais 7, 11, 14, 20 et 23 du plan expérimental.

Tableau 12 : Pourcentage de réduction des biofilms *Staphylococcus aureus* en fonction des conditions de croissance et des traitements appliqués.

Traitements	%Réduction des biofilms de <i>S. aureus</i> (moyenne ± écart-type)				
	E7 (pH 6 ; %pro 3,75 ; %suc 10)	E11 (pH 4 ; %pro 1,25 ; %suc 20)	E14 (pH 6 ; %pro 1,25 ; %suc 10)	E20 (pH 7 ; %pro 2,5 ; %suc 15)	E23 (pH 5 ; %pro 2,5 ; %suc 5)
T1 (Ef)	^a 0 ± 0 ^a	^{abc} 14,30 ± 9,54 ^a	^a 0 ± 0 ^a	^a 0 ± 0 ^a	^a 0 ± 0 ^a
T11 (Ec)	^a 3,31 ± 4,41 ^a	^a 0 ± 0 ^a	^a 8,01 ± 5,34 ^a	^{ab} 26,37 ± 14,55 ^{ab}	^b 35,82 ± 4,7 ^b
T3 (Ef + ½C)	^{bc} 32,94 ± 8,68 ^a	^{abc} 16,76 ± 11,19 ^a	^{bc} 42,90 ± 2,25 ^a	^{ab} 31,28 ± 10,15 ^a	^b 46,1 ± 6,98 ^a
T13 (Ec + ½C)	^{bcd} 35,99 ± 2,5 ^a	^d 41,98 ± 0,42 ^a	^{bc} 45,77 ± 1,58 ^a	^{ab} 27,52 ± 13,45 ^a	^b 33,09 ± 9,83 ^a
T4 (Ef + ½E)	^b 25,42 ± 3,11 ^{abc}	^{ab} 8,25 ± 2,97 ^a	^b 28,27 ± 5,24 ^{bc}	^{ab} 13,81 ± 7,01 ^{ab}	^b 42,71 ± 2,47 ^c
T14 (Ec + ½E)	^b 25,15 ± 2,6 ^a	^{bcd} 27,91 ± 1,74 ^a	^c 49,76 ± 4,19 ^b	^{ab} 29,47 ± 7,02 ^a	^b 46,71 ± 5,11 ^b
Tt1 (Ef+EI+B)	^{cd} 46 ± 2,4 ^a	^{cd} 33,14 ± 7,36 ^a	^{bc} 40,29 ± 8,55 ^a	^b 36,6 ± 2,5 ^a	^b 49,42 ± 2,24 ^a
Tt2 (Ec+V+Ef+EI+B+V)	^d 51,18 ± 1,8 ^a	^d 44,75 ± 3,5 ^a	^c 57,94 ± 5,13 ^a	^b 44,27 ± 7,61 ^a	^b 46,72 ± 5,89 ^a

Au sein de la même colonne, les valeurs précédées des lettres différentes sont significativement différentes. Au sein de la même ligne, celles suivies des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

T1 (eau froide) ; **T11** (eau chaude) ; **T3** (eau froide + ½ détergent chimique) ; **T13** (eau chaude + ½ détergent chimique) ; **T4** (eau froide + ½ détergent enzymatique) ; **T14** (eau chaude + ½ détergent enzymatique) ; **Tt1** témoin (eau froide + détergent enzymatique liquide + brossage) ; **Tt2** témoin (eau chaude + vortex + eau froide + détergent enzymatique liquide + brossage + vortex) ; **%pro** (%protéine) ; **%suc** (%sucre).

De ce tableau, on observe que le niveau d'efficacité des traitements reste constant d'une condition à une autre pour certains traitements et varie pour d'autres dont les traitements T4, T11 et T14. Le traitement témoin T₂ avec le niveau de réduction le plus élevé (57,94% sur les biofilms formés dans E14) a été le plus efficace dans toutes les conditions de formation de biofilm excepté dans la condition E23.

I.3.3. Formation des biofilms dans un lait caillé, un jus d'hibiscus et un jus de baobab et influence sur l'efficacité des traitements

Les charges microbiennes en cellules planctoniques ainsi que les densités optiques obtenues par dosage de la quantité de biofilms formés suite à l'incubation des boissonsensemencées en monoculture ou non sont présentées dans le tableau 13 ci-après.

Tableau 13 : Quantification des biofilms formés dans les boissons sucrées et charges en cellules planctoniques associées.

Boisson	DO_{form}	CC (log cell/mL)
Lait caillé-NE	0,138	8,6
Lait caillé-SE	0,146	10,1
Lait caillé-SA	0,142	9,7
Hibiscus-NE	0,139	9,3
Hibiscus-SE	0,134	8,5
Hibiscus-SA	0,133	8,8
Baobab-NE	0,138	8,8
Baobab-SE	0,131	8,7
Baobab-SA	0,121	8,7

NE : nonensemencé ; SE : *Salmonella Enteritidis* ; SA : *Staphylococcus aureus* ; DO_{form} : densité optique représentant la quantité de biofilm formé dans la boisson ; CC : concentration cellulaire des cellules planctoniques.

De ce tableau, on observe que l'ensemencement des souches d'étude en monoculture à une charge de 6 log cell/mL dans les boissons d'hibiscus et de baobab n'a pas influencé la quantité de biofilms formés et encore moins la charge microbienne en cellules planctoniques. A contrario, dans le lait caillé, cet ajout a entraîné une augmentation de la charge des cellules planctoniques ainsi que de la quantité de biofilms formés après la culture des souches.

Après application des 04 traitements choisis (T3, T4, T₁ et T₂), différents niveaux de réduction des biofilms formés dans les boissons sucrées ont été notés (tableau 14).

Tableau 14 : Pourcentage de réduction des biofilms microbiens formés dans des boissons sucrées locales.

Conditions	%Réduction des biofilms (moyenne ± écart-type)			
	T3 (Ef + ½C)	T4 (Ef + ½E)	Tt1 (Ef + El + B)	Tt2 (Ec+V+Ef+El+ B+V)
Lait caillé-NE	^a 1,35 ± 1,35 ^a	^c 49,89 ± 2,43 ^b	^c 59,91 ± 0 ^c	^b 62,5 ± 0,8 ^c
Lait caillé-SE	^a 0 ± 0 ^a	^c 55,12 ± 4,5 ^b	^c 49,02 ± 0 ^b	^{ab} 57,36 ± 0,56 ^b
Lait caillé-SA	^a 0 ± 0 ^a	^c 55,17 ± 5,39 ^b	^c 50,3 ± 9,09 ^b	^{ab} 54,26 ± 0,61 ^b
Hibiscus-NE	^a 0 ± 0 ^a	^{ab} 12,98 ± 0,1 ^b	^{bc} 34,45 ± 1,7 ^c	^a 34,47 ± 1,9 ^c
Hibiscus-SE	^a 0 ± 0 ^a	^b 20,54 ± 4,34 ^{ab}	^a 2,56 ± 2,56 ^{ab}	^a 33,47 ± 10,09 ^b
Hibiscus-SA	^a 0 ± 0 ^a	^{ab} 13,89 ± 1,21 ^a	^{bc} 38,6 ± 4,32 ^b	^{ab} 42,52 ± 5,62 ^b
Baobab-NE	^a 0 ± 0 ^a	^a 0,2 ± 0,2 ^a	^{ab} 16,31 ± 5,43 ^{ab}	^a 35,23 ± 4,98 ^b
Baobab-SE	^a 0 ± 0 ^a	^a 0,25 ± 0,25 ^a	^{bc} 33,47 ± 9,11 ^b	^{ab} 47,9 ± 0,67 ^b
Baobab-SA	^a 0 ± 0 ^a	^a 0 ± 0 ^a	^c 51,78 ± 2,65 ^c	^{ab} 40,9 ± 2,18 ^b

Au sein de la même colonne, les valeurs précédées des lettres différentes sont significativement différentes. Au sein de la même ligne, celles suivies des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

NE : nonensemencé ; **SE** : *Salmonella Enteritidis* ; **SA** : *Staphylococcus aureus* ; **T3** : eau froide + ½ détergent chimique de la concentration recommandée par le fabricant ; **T4** : eau froide + ½ détergent enzymatique de la concentration recommandée par le fabricant ; **Tt1** et **Tt2** : traitements témoins.

Le traitement chimique T3 testé a été presque inactif dans toutes les conditions (%Red $\leq 1,35$). Le traitement enzymatique T4 quant à lui présente une variation d'efficacité d'une condition à une autre. Celui-ci a été plus capable d'éliminer les biofilms formés à partir du lait caillé (%Red 49,89 - 55,17). Une efficacité moindre a été notée avec le jus d'hibiscus (%Red 12,98 - 20,54). Celle-ci a été presque nulle avec le jus de baobab (%Red 0 - 0,25). Pour ce qui est des traitements témoins, ils ont été plus efficaces que les deux traitements tests et leur capacité à éliminer les biofilms avait tendance à varier significativement d'une condition à une autre.

II. DISCUSSION

Le biofilm est un micro-écosystème constitué d'une communauté microbienne adhérente à un support et recouverte par une matrice extracellulaire. Il peut être responsable d'infection, de maladie et d'invasion des surfaces. Les biofilms adhèrent sur de nombreuses surfaces et leur élimination est une réelle préoccupation à cause de leur résistance aux agents antimicrobiens (**Fastrez & Delhalle, 2022**). Le problème que représente les biofilms s'étend au marché des boissons sucrées de rue vendues dans des bouteilles plastiques réutilisées (BPR). En effet, les microorganismes en présence des substrats de croissance tels que les résidus des boissons sucrées dans les BPR, se développent grandement (**Sun et al., 2017**). La croissance de ces derniers s'accompagne par leur adhésion aux bouteilles plastiques en formant des biofilms (**Licciardello, 2024**). L'élimination des biofilms est essentielle afin de préserver la santé des consommateurs des boissons sucrées de rue. Les travaux menés au cours de cette étude ont permis d'évaluer la variabilité de l'efficacité des pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques réutilisées sur l'élimination des biofilms de *Salmonella Enteritidis* et de *Staphylococcus aureus* formés dans différentes conditions.

La formation des biofilms est sous l'influence de nombreux facteurs à l'exemple du substrat de croissance des microorganismes et du support de fixation (**Gemba et al., 2022 ; Pessereau, 2015 ; Remy, 2015**). C'est dans cette lancée qu'il a été pensé que la diversité de boissons sucrées vendues dans les BPR influencerait les caractéristiques des biofilms formés dans les bouteilles plastiques et donc leur résistance aux agents de nettoyage. Un plan expérimental a été utilisé afin d'évaluer la formation des biofilms des souches d'étude dans différentes conditions. La production de biofilms n'est pas une compétence propre à tous les microorganismes. Cette capacité varie en fonction de l'espèce microbienne et des conditions de croissance (**Tremblay et al., 2014**). De cette étude menée, la souche de *S. aureus* avait tendance à former plus de biofilms que celle de *S. Enteritidis* dans les différents essais. Le matériel génétique des cellules serait à l'origine de la variation des capacités des microorganismes à former des biofilms (**Vashchenko et al., 2021**). Les grandes propriétés d'adhésion de *S. aureus* ont déjà été prouvées et celles-ci seraient liées à son fort caractère hydrophobe qui facilite son adhésion aux supports selon les conditions de croissance (**Hamadi et al., 2005**).

La croissance des biofilms des deux souches cibles au cours de cette étude a été stimulée par une augmentation du pH de la zone acide vers la neutre. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus lors des travaux de **Roy et al. (2021)** où la formation des biofilms des souches de *Salmonella Kentucky* était optimisée à pH 7. Des travaux menés, la formation des

biofilms de *S. Enteritidis* était largement sous l'influence du pH. Ce dernier peut influencer les propriétés d'attachement ou de formation des biofilms des souches microbiennes (Roy *et al.*, 2021). L'effet positif du pH lorsqu'il tend vers le neutre serait dû au fait que l'adhésion de certains microorganismes est maximale à leur optimum métabolique (Boutaleb, 2007), qui pour les deux souches d'étude est compris entre 6,5 et 7,5. Le pH influence également la stabilité des EPS (Substances Polymériques Extracellulaires), l'un des principaux constituant des biofilms qui jouent un important rôle lors de la fixation (Hiltunen *et al.*, 2019). Les pH acides (3 à 4) inhibent la formation de biofilms car, ces valeurs de pH peuvent altérer l'ADN bactérien et modifier l'équilibre du gradient de pH des membranes cellulaires. Ceci favorise l'accumulation d'acide dans la cellule et l'inhibition du métabolisme microbien (Roy *et al.*, 2021).

De nombreuses études attestent que les bactéries peuvent former des biofilms durant la phase exponentielle ou stationnaire de leur croissance (Boutaleb, 2007 ; Savijoki *et al.*, 2020). La formation de biofilms se réalise préférentiellement dans des conditions de stress, pouvant être lié à la limitation en nutriments notamment en phase stationnaire de croissance des microorganismes (Boutaleb, 2007). Des travaux comme ceux de Savijoki *et al.* (2020) ont démontré que les biofilms formés à la phase stationnaire étaient généralement plus résistants aux antimicrobiens. Ceci s'expliquerait par une importante quantité de polymères accumulés durant des temps prolongés et contribuerait ainsi à améliorer l'imperméabilité de la matrice du biofilm aux antimicrobiens. Au cours de cette étude, une augmentation de la durée du temps d'incubation avait tendance à favoriser la formation de biofilm. Les souches étudiées seraient probablement en phase stationnaire de leur croissance à des durées d'incubation supérieures 24h lorsque les conditions de croissance leur sont favorables. Pour pouvoir l'illustrer, *S. aureus* a formé plus de biofilms à E14 (pH= 6 ; %protéine= 1,25 ; %sucre= 10 ; temps d'incubation= 48h) avec un pourcentage de formation de 110,48 et moins à E5 (pH= 6 ; %protéine= 1,25 ; %sucre= 10 ; temps d'incubation= 24h) avec 39,63%. *S. Enteritidis* quant à lui a formé plus de biofilms à E7 (pH= 6 ; %protéine= 3,75 ; %sucre= 10 ; temps d'incubation= 48h) avec un pourcentage de formation de 107,41 et moins à E16 (pH= 6 ; %protéine= 3,75 ; %sucre= 10 ; temps d'incubation= 24h) avec 3,1%. Il est à noter que, la concentration cellulaire des cellules planctoniques (CC) issues de ces conditions pour chaque souche varie peu. *S. aureus* à E14 avait une CC= 11,2 log cell/mL et à E5 une CC= 11,63 log cell/mL. *S. Enteritidis* à E7 avait une CC= 10,63 log cell/mL et à E16 une CC= 9,97 log cell/mL. Le test de Student a permis de montrer que la charge des cellules planctoniques dans les différentes conditions du plan expérimental influence significativement la quantité de biofilms formés ($p < 0,05$) avec des R^2

de 0,17 et 0,59 respectives pour *S. Enteritidis* et *S. aureus*. Cette différence du coefficient de détermination d'une souche à l'autre peut être due à l'état physiologique des cellules au cours de l'incubation qui favorise ou non la formation de biofilms.

Durant cette étude, l'augmentation de la concentration en sucre favorisait la croissance des biofilms de *S. aureus* jusqu'à un certain seuil (entre 10 et 15%) au-delà duquel le sucre a un effet réducteur (20 à 25%). Cette variation de l'influence de la concentration en sucre est en accord avec les travaux de **Roy et al. (2021)**. Cependant, la variation seule du sucre n'influçait pas grandement la formation des biofilms de *S. Enteritidis*. Au cours de certains travaux, il a été observé qu'en fonction de sa concentration dans le milieu, le sucre a des effets positifs, neutres ou négatifs sur la formation des biofilms (**Roy et al., 2021 ; Vashchenko et al., 2021**). La production de la matrice d'exo-polymères du biofilm dépend des sucres, qui chez les staphylocoques, représentent les principaux éléments constitutifs (**Vashchenko et al., 2021**). Suivant les équations de modélisation, la teneur en protéines quant à elle influçait peu la formation de biofilms des souches d'étude. Toutefois, l'on observe qu'à des pH proches du neutre, l'augmentation de la teneur en protéines s'accompagne d'une augmentation de la quantité de biofilms formés. En effet, les protéines du milieu peuvent s'incruster dans la matrice d'exo-polymères du biofilm et améliorer sa stabilité (**Liu et al., 2024**).

Les microorganismes ont de grandes capacités à adhérer sur des supports plastiques en formant des biofilms (**Baomog et al., 2020 ; Yu et al., 2010**) et l'élimination de ces structures est un défi pour les commerçants de la rue qui réutilisent les bouteilles plastiques. Les cibles visées lors du nettoyage sont principalement les germes microbiens, mais ceux enrobés dans le biofilm ne peuvent être atteints qu'en traversant ou en élimant la barrière que constitue la matrice du biofilm. Les pratiques de nettoyage de rue des BPR les plus simples mises en place sont le trempage dans l'eau froide (25°C/ 15 min) ou chaude (80°C/ 15 min). Au cours de cette étude, ces traitements n'ont pas eu de grandes aptitudes à éliminer les biofilms formés dans le bouillon nutritif bien que l'eau chaude ait été plus efficace que l'eau froide. La faible efficacité de l'eau chaude durant cette étude va à l'encontre des résultats obtenus par **String et al. (2020)** où le trempage dans de l'eau chaude à 80°C parvenait à éliminer des biofilms fixés sur des robinets et des coupons de seau. L'eau chaude permettrait de fondre les EPS réduisant ainsi l'adhérence des biofilms à leur support de fixation (**String et al., 2020**). L'inefficacité de l'eau chaude pourrait être due à la chute rapide de température durant le temps de traitement (15 min).

Les détergents chimiques ou enzymatiques sont également utilisés pour le nettoyage des BPR. Les traitements avec le détergent chimique testé ont été moins efficaces que ceux avec

les détergents enzymatiques bien que des différences significatives n'ont pas toujours été observées. Néanmoins, la réduction des biofilms par le détergent chimique serait liée à l'action des tensioactifs ou agents de surface qu'il contient (**Mouafo et al., 2023**). Ces agents se lient préférentiellement aux graisses et autres salissures grâce à leur caractère lipophile, les détachant du support de fixation et les transférant dans l'eau de nettoyage où elles seront versées grâce à leur caractère hydrophile. Les proportions de lipides au sein de la matrice des biofilms étant moins importantes que celles des protéines ou des EPS (**Liu et al., 2024**), cela pourrait expliquer l'efficacité moindre des détergents chimiques. Ces derniers ont alors du mal à diffuser dans la matrice et à rompre les liaisons du biofilm au support de fixation (**Vickery et al., 2004**). La meilleure réduction des biofilms avec les détergents enzymatiques en comparaison aux détergents chimiques est similaire aux résultats des travaux de **Da Costa et al. (2016)**. L'efficacité des détergents enzymatiques serait liée au fait qu'ils contiennent en plus des agents de surface, des enzymes capables de dissoudre spécifiquement la matrice des biofilms. Ces enzymes à l'exemple des protéases ou des polysaccharides hydrolases dégradent la matrice extracellulaire qui est principalement constituée de protéines et polysaccharides (70%–80%) (**Liu et al., 2024 ; Tsiaprazi-Stamou et al., 2019**). L'activité du détergent enzymatique en poudre testé avait tendance à régresser lorsqu'il était mélangé à de l'eau chaude (80°C). Des températures élevées auraient pour effet de dénaturer certaines enzymes réduisant ainsi leur efficacité (**Sari et al., 2021**). Le mouvement d'agitation lors du lavage manuel des BPR est généralement appliqué (**Mouafo et al., 2022**) et ce dernier a été simulé par une agitation au vortex à 2400 trs/min. Les traitements qui se sont faits avec le vortex avaient globalement des niveaux de réduction de biofilms plus élevés que ceux faits par simple trempage. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus durant les travaux de **Gagnon & Slawson (1999)**. Le passage au vortex des solutions de nettoyage ou du brossage des bouteilles permettrait d'appliquer une pression qui fragilise et fractionne les biofilms en de plus petites portions. Ces forces mécaniques réduisent l'adhésion des biofilms aux supports facilitant leur élimination.

L'application des traitements sur des biofilms formés dans différentes conditions a permis d'observer que l'efficacité de ces derniers varie généralement d'une condition à une autre bien qu'il n'existait pas toujours de différence significative. Cette variation d'efficacité serait due à la formation de biofilms dont les caractéristiques diffèrent en fonction du milieu de croissance. En effet, les composants du substrat de croissance des microorganismes peuvent entrer dans la composition de la matrice des biofilms (**Pessereau, 2015 ; Polanska et al., 2005**) et donc influencer leurs propriétés de résistance aux agents de nettoyage. Contrairement aux

travaux menés *in vitro* dans des solutions nutritives, le traitement chimique T3 (eau froide + ½ détergent chimique) testé n'a pas été efficace sur les biofilms formés à partir des matrices alimentaires (lait caillé, jus d'hibiscus, jus de baobab). Pour ce qui est du traitement enzymatique T4 (eau froide + ½ détergent enzymatique), seuls les biofilms formés dans le lait caillé étaient sensibles (réduction 49,89–55,17%) et ceux du jus d'hibiscus l'étaient moins (réduction 12,98–20,54%). Ce traitement test n'a pas été capable d'éliminer les biofilms formés dans le jus de baobab (réduction $\leq 0,25\%$). Le jus de baobab utilisé dans cette étude contenait moins de protéines (0,25 g/100 g) et de sucre (10 g/ 100 g) que le lait caillé (4 g et 15,65 g/100 g respectivement) (tableau 6). Les composants du milieu environnant pouvant entrer dans la composition du biofilm (**Liu et al., 2024**), ces polymères seraient présents en d'importantes quantités dans les biofilms issus du lait caillé en comparaison aux deux autres jus. Les détergents enzymatiques testés contiendraient des protéases et polysaccharides hydrolases, ce qui peut expliquer leur efficacité sur les biofilms formés dans le lait caillé contrairement à ceux du jus de baobab. A l'issue des travaux menés, aucune pratique de rue de nettoyage des BPR n'a été capable d'éliminer la totalité des biofilms. La persistance des biofilms adhérents aux supports plastiques est un danger pour la santé des consommateurs des boissons sucrées de rue vendues dans les BPR. Les agents de nettoyage chimiques peuvent avoir un caractère toxique et donc leur usage est de moins en moins recommandé. De nombreux brevets de procédés de nettoyage recommandent l'usage de détergents enzymatiques composés d'une association d'enzymes à des désinfectants (**Boels & Blackman, 2016**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Au terme de cette étude qui avait pour objectif d'hierarchiser les pratiques de nettoyage de rue des bouteilles plastiques permettant d'éliminer les biofilms de *Salmonella Enteritidis* et de *Staphylococcus aureus* selon leurs conditions de formation, il ressort que :

- ❖ Plus les traitements incluent des agents de nettoyage comme l'ajout de détergent, le passage au vortex ou le brossage plus l'élimination des biofilms est meilleure. Les détergents enzymatiques tendent à être plus efficaces que les chimiques.
- ❖ L'augmentation du pH vers le neutre, de la teneur en protéine et du temps d'incubation ont une influence positive sur la formation des biofilms, contrairement à l'augmentation de la teneur en sucre qui la réduit. Les formations des biofilms de *Staphylococcus aureus* et de *Salmonella Enteritidis* sur les BPR sont principalement déterminées de façon respective par la teneur en sucre et le pH.
- ❖ L'efficacité des traitements varie significativement d'une condition de formation des biofilms à une autre. Toutefois peu importe la condition de formation, aucun traitement n'a été capable d'éliminer la totalité des biofilms y compris les traitements avec un détergent enzymatique et la brosse.

PERSPECTIVES

Dans l'optique d'améliorer ce travail et de trouver de meilleurs traitements capables d'éliminer les biofilms formés dans les bouteilles plastiques, il serait judicieux de :

- ❖ Rechercher d'autres solutions pratiques pour les commerçants à même d'éliminer rapidement les biofilms ;
- ❖ Evaluer le niveau de désactivation des cellules microbiennes incrustées dans les biofilms après application des pratiques de nettoyage des BPR.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrokwah S., Ekumah B. & Abrokwah F. K. (2020).** Microbial assessment of plastic bottles reused for packaging food products in Ghana. *Food Control*, 109, 106956.
- Agence de la santé publique du Canada. (2012).** Fiche technique santé-sécurité : Agents pathogènes—*Staphylococcus aureus*. *Gouvernement du Canada*. <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-technique-s-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/staphylococcus-aureus.html>
- Andino A. & Hanning I. (2015).** *Salmonella enterica* : survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-16.
- Archer N. K., Mazaitis M. J., Costerton J. W., Leid J. G., Powers M. E. & Shirliff M. E. (2011).** *Staphylococcus aureus* biofilms : properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-459.
- Baomog A. M. B., Tchuenchieu A. D., Ze N. N., Sado S. L. K. & Essia J.-J. N. (2020).** Impact of PVC and stainless-steel materials on *Staphylococcus aureus* biofilms production and their thermodeactivation as affected by pH, time and NaCl. *International Research Journal of Advanced Engineering and Science*, 5(2), 107-112.
- Bellal M. & Brahim R. (2021).** Les infections à salmonelles et traitement par les probiotiques [Sciences biologiques]. Mémoire, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy, 45p.
- Bello O., Bello T., Fashola M. & Oluwadun A. (2014).** Microbiological quality of some locally-produced fruit juices in Ogun State, South western Nigeria. *E3 Journal of Microbiology Research*, 2(1), 001-008.
- Boels G. & Blackman G. (2016).** *Procédé d'élimination des biofilms*, (Brevet WO 2012/048 758).
- Boutaleb N. (2007).** Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable [Chimie]. Thèse, Université de Bretagne-Sud, 194p.
- Bridier A., Briandet R., Thomas V. & Dubois-Brissonnet F. (2011).** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants : A review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.
- Cappello S. & Guglielmino S. P. (2006).** Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 205-207.
- Da Costa Luciano C., Olson N., Tipple A. F. V. & Alfa M. (2016).** Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. *American Journal of Infection Control*, 44(11), 243-249.
- Division de la sécurité alimentaire du Luxembourg. (2018).** Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires Lignes directrices pour l'interprétation. Le gouvernement du Grand-duché du Luxembourg. <http://www.securite-alimentaire.public.lu/>
- Djordjevic D., Wiedmann M. & McLandsborough L. A. (2002).** Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2950-2958.

- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. (2023).** Three clusters of *Salmonella Enteritidis* ST11 infections linked to chicken meat and chicken meat products. *EFSA Supporting Publications*, 20(11), 001-034.
- Fastrez S. & Delhalle L. (2022).** Composition détergente pour l'élimination des biofilms sur des installations industrielles, (Brevet WO 2022/079318 A1).
- Gagnon G. A. & Slawson R. M. (1999).** An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 34(3), 203-214.
- Gemba M., Rosiak E., Nowak-Życzyńska Z., Kałęcka P., Łodykowska E. & Kolożyn-Krajewska D. (2022).** Factors Influencing Biofilm Formation by *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Pantoea* spp., and *Bacillus* spp. Isolated from Human Milk Determined by PCA Analysis. *Foods*, 11(23), 3862.
- González-Rivas F., Ripolles-Avila C., Fontecha-Umaña F., Ríos-Castillo A. G. & Rodríguez-Jerez J. J. (2018).** Biofilms in the spotlight : detection, quantification, and removal methods : biofilms DQR in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1261-1276.
- Hamadi F., Latrache H., Mabrrouki M., Elghmari A., Outzourhit A., Ellouali M. & Chtaini A. (2005).** Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 19(1), 73-85.
- Henry P., Edward M. J., Ogonna O. E. & Emmanuel I. C. (2017).** Microbiological assessment of some cooked ready-to-eat street foods sold in Calabar and its environs. *Journal of Food Security*, 5(3), 100-106.
- Hiltunen A. K., Savijoki K., Nyman T. A., Miettinen I., Ihalainen P., Peltonen J. & Fallarero A. (2019).** Structural and functional dynamics of *Staphylococcus aureus* biofilms and biofilm matrix proteins on different clinical materials. *Microorganisms*, 7(12), 584.
- Hoceini A., Benbaha K., Adoul H., Bensaber A., Tahraoui H., Chelghoum H., Amrane A. & Zhang J. (2023).** Evaluation of biofilm forming potential and antimicrobial resistance profile of *S. aureus* and *P. aeruginosa* isolated from peripheral venous catheters and urinary catheters in Algeria, in vitro study. *Advanced Research in Life Sciences*, 7(1), 83-92.
- Idrees M., Sawant S., Karodia N. & Rahman A. (2021).** *Staphylococcus aureus* biofilm : morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602.
- Institut Pasteur. (2018).** *Staphylocoque doré : Un nouveau mécanisme impliqué dans la virulence et la résistance aux antibiotiques.* Institut Pasteur. <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/actualites/staphylocoque-dore-nouveau-mecanisme-implique-virulence-resistance-aux-antibiotiques>
- Kang H., Loui C., Clavijo R. I., Riley L. W. & Lu S. (2006).** Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in chicken egg albumen. *Epidemiology and Infection*, 134(5), 967-976.
- Karst M. J. (2005).** *Staphylococcus aureus*. *Encyclopedia of Toxicology*, 2(4), 86-87.
- Licciardello F. (2024).** Unexpected possible consequences of plastic packaging reuse. *Current Opinion in Food Science*, 56, 101131.

- Liu Y., Zhu H., Dou X., Jia K., Panagou E. Z., Zhang H., Xu A. & Dong Q. (2024).** The influence of nutrients on biofilm formation of an ST87 strain of *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Science and Technology*, 191, 115658.
- Maiworé J., Bouba A. A., Ngoune L. T. & Mbofung C. M. (2016).** Source of water and microbial quality of some beverages consumed on the streets of great agglomerations of the Far-North region of Cameroon. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2(6), 665-670.
- Marshall J. M., Flechtner A. D., La Perle K. M. & Gunn J. S. (2014).** Visualization of extracellular matrix components within sectioned *Salmonella* biofilms on the surface of human gallstones. *PLoS ONE*, 9(2), 89243.
- Mouafo H. T., Adjele J. J. B., Hell R. H., Baomog A. M. B., Tchuenchieu A. D., Kamgnia J. A. N., Manet L., Bonny P., Baleba R. M. M. & Medoua G. N. (2022).** Popular cleaning systems of bottles reused for traditional food packaging in the city of Yaoundé (Cameroon) and study of their prospective effectiveness on biofilms. *Frontiers in Food Science and Technology*, 2, 1060880.
- Mouafo H. T., Sokamte A. T., Manet L., Mbarga A. J. M., Nadezdha S., Devappa S. & Mbawala A. (2023).** Biofilm inhibition, antibacterial and antiadhesive properties of a novel biosurfactant from *Lactobacillus paracasei* N2 against multi-antibiotics-resistant pathogens isolated from braised fish. *Fermentation*, 9(7), 646.
- Ngueugang W. A. L., Tientche B., Asaah S., Lucien Fouamno Kanga H. & Bsadjo Tchamba G. (2021).** Microbiological assessment of ready-to-eat food sold in urban primary schools, Douala, Littoral Region, Cameroon. *International Journal of Food Science and Biotechnology*, 6(2), 36.
- Obeizi Z. & Benbouzid H. (2020).** Evaluation de l'activité antibactérienne et anti-biofilm des nanoparticules de dioxyde d'étain (SnO₂). *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 7(2), 22-34.
- Ogodo A. C., Ugbogu, O.C., Ekeleme, U.G. & Nwachukwu, N.O. (2016).** Microbial quality of commercially packed fruit juices in South-East Nigeria. *Journal of Basic And Applied Research*, 2(3), 240-245.
- Organisation Mondiale de la Santé [OMS]. (2018).** *Salmonella (infections à, non typhiques)*. Organisation mondiale de la santé. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Organisation Mondiale de la Santé [OMS]. (2020).** *Sécurité sanitaire des aliments*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Peiffer B. (1999).** Salmonelloses et fièvres thyphoïdes. Liste hygiène. <http://www.liste-hygiene.org/SALMON.html>
- Pessereau C. (2015).** Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale [Génie des procédés]. Thèse, Université Nantes Angers Le Mans, 221p.
- Polanska M., Huysman K. & Van Keer C. (2005).** Investigation of microbially available phosphorus (MAP) in flemish drinking water. *Water Research*, 39(11), 2267-2272.
- Putturu R., Eevuri T., Ch B. & Nelapati K. (2015).** *Salmonella Enteritidis* – Food borne pathogen – a review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(1), 86-95.

- Rana V. S. & Ahirrao M. (2016).** A study on street food preparation practices in Jalgaon city. *IBMRD's Journal of Management & Research*, 5(2), 27-32.
- Remy P.-P. (2015).** Rôle de différents compartiments microbiens (biofilms, matières en suspension, sédiments de surface) et de leurs constituants (bactéries, polymères extracellulaires et biominéraux) sur la méthylation et la réduction de HgII. Thèse, Université de Lorraine, 310p.
- Roux A. & Ghigo J.-M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.
- Roy P. K., Ha A. J.-W., Mizan Md. F. R., Hossain Md. I., Ashrafudoulla Md., Toushik S. H., Nahar S., Kim Y. K. & Ha S.-D. (2021).** Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poultry Science*, 100(7), 101209.
- Roy R., Tiwari M., Donelli G. & Tiwari V. (2018).** Strategies for combating bacterial biofilms : A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522-554.
- Salamandane A., Silva A. C., Brito L. & Malfeito-Ferreira M. (2021).** Microbiological assessment of street foods at the point of sale in Maputo (Mozambique). *Food Quality and Safety*, 5, 1-9.
- Sari A., Anwa A. & Rozen N. (2021).** The effect of high temperature on α -amylase enzyme activity in the germination of several rice varieties (*Oryza sativa*). *JERAMI Indonesian Journal of Crop Science*, 3(2), 50-54.
- Savijoki K., Miettinen I., Nyman T. A., Kortesoja M., Hanski L., Varmanen P. & Fallarero A. (2020).** Growth mode and physiological state of cells prior to biofilm formation affect immune evasion and persistence of *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 8(1), 106.
- Stepanovic S., Cirkovic I., Ranin L. & Svabic-Vlahovic M. (2004).** Biofilm formation by *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428-432.
- String G., Domini M., Mirindi P., Brodsky H., Kamal Y., Tatro T., Johnston M., Badr H. & Lantagne D. (2020).** Efficacy of locally-available cleaning methods in removing biofilms from taps and surfaces of household water storage containers. *Npj Clean Water*, 3(1), 13.
- Sun X., Kim J., Behnke C., Almanza B., Greene C., Miller J. & Schindler B. (2017).** The cleanliness of reusable water bottles : How contamination levels are affected by bottle usage and cleaning behaviors of bottle owners. *Food Prot Trends*, 37, 392-402.
- Targant H. (2010).** L'îlot de multirésistance aux antibiotiques, Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) : Variabilité, diffusion inter—Espèces et implication dans la virulence [Sciences de la Vie et de la Santé]. Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1, 279p.
- Toyofuku M., Inaba T., Kiyokawa T., Obana N., Yawata Y. & Nomura N. (2016).** Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 7-12.
- Tremblay Y. D. N., Hathroubi S. & Jacques M. (2014).** Les biofilms bactériens : Leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 78, 110-116.

- Tsiaprazi-Stamou A., Monfort I. Y., Romani A. M., Bakalis S. & Gkatzionis K. (2019).** The synergistic effect of enzymatic detergents on biofilm cleaning from different surfaces. *Biofouling*, 35(8), 883-899.
- Vashchenko A. O., Voronkova Y. S., Kulyk E. E., Snisar O. S., Sidashenko O. I. & Voronkova O. S. (2021).** Influence of sugars on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(2), 321-325.
- Vickery K., Pajkos A. & Cossart Y. (2004).** Removal of biofilm from endoscopes : Evaluation of detergent efficiency. *American Journal of Infection Control*, 32(3), 170-176.
- Webber B., Oliveira A. P. de, Pottker E. S., Daroit L., Levandowski R., Santos L. R. dos, Nascimento V. P. do, & Rodrigues L. B. (2019).** *Salmonella Enteritidis* forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. *Ciência Rural*, 49(7), 20181022.
- World Health Organization [WHO]. (2015).** WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1
- World Health Organization [WHO]. (2022).** Providing healthy and enough food for everyone : Nutrition, Food safety and Food crises in Africa. World Health Organization Region office for Africa. https://files.aho.afro.who.int/afahobckpcontainer/production/files/iAHO_Nutrition_Regional_Factsheet.pdf
- Yu J., Kim D. & Lee T. (2010).** Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Science and Technology*, 61(1), 163-171.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture.

Bouillon nutritif (Rapid Labs, CM-NBE036) : composition par litre

- Peptone 5 g
- Extrait de viande 1 g
- Extrait de levure 2 g
- Chlorure de sodium 5 g

Gélose nutritive : composition par litre

- Peptone 5 g
- Extrait de viande 1 g
- Extrait de levure 2 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Agar 15 g.

Annexe 2 : Quelques photos de manipulation.



(a)



(b)



(c)

Figure 10 : Aperçu de quelques solutions éthanoliques dans lesquelles sont dissous du cristal violet.