

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana



Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département des sciences biologiques  
Mémoire de fin d'étude  
En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en sciences biologiques  
Spécialité: Microbiologie Appliquée

## Thème

**Etude du potentiel de formation du biofilm par les Staphylocoques isolés des infections animales et humaines**

Soutenu le : 11/07/2019

Présenté par :

BOUKERA ABBACI Yazid

DAOUDI Nesrine

Devant le jury

M <sup>r</sup> CHEURFA M.	MCB	Président	UDB Khemis Miliana
M <sup>me</sup> LAISSAOUI A.	MCB	Examinatrice	UDB Khemis Miliana
M <sup>lle</sup> AIZA A.	MAA	Examinatrice	UDB Khemis Miliana
M <sup>r</sup> ACHEK R.	MAA	Promoteur	UDB Khemis Miliana
M <sup>me</sup> DIDOUH N.	MCB	Co-promotrice	UDB Khemis Miliana

Année universitaire : 2018/2019

# Remerciements

El hamdolillah de nous avoir donné le courage la patience et la puissance pour achever ce travail modeste.

On exprime nos profonds remerciements à l'encadreur de ce mémoire, monsieur le Rachid ACHEK, pour sa grande disponibilité, son écoute et son suivi tout au long de ce travail. Ainsi que pour sa patience et sa compréhension des situations diverses et variées et son encouragement à finir ce travail.

On tient aussi a remercié notre Co-promotrice Madame Asma DIDOUH pour son œil critique m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections.

On espère qu'ils trouvent dans ces mots toute notre reconnaissance pour leurs précieux conseils.

Nous exprimons nos respectueux remerciements aux membres du jury :

- **Mr CHEURFA. M** - Président du Jury,

- **M<sup>me</sup> LAISSAOUI A.**- Examinatrice,

-**M<sup>lle</sup> AIZA A** - Examinatrice,

Pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer notre travail.

On tient à remercier Docteur ZIBOUCHE Abdoullah et toute l'équipe service de bactériologie de nous avoir accueillie au sien de leur labo de nous avoir traité avec professionnalisme et de leur patience, un spéciale merci à vous Yassine, Fatiha, Houda, et Ibtissam.

On tient aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire pédagogique microbiologie au sien de l'université de MEDEA, spécialement Mr NABI Ibrahim et Mr RAHAL Mohamed de nous avoir accueillis, bien traité et d'avoir partagé avec nous leur connaissance.

Un grand merci à l'équipe de l'université Djilali Bounaama KHMIS MILIANA et un spécial merci au responsables des laboratoires de l'université, et a tous nos prof on vous remercie pour votre patience et votre guidance.

On tient à remercier nos parent sans eux on ne serait pas là, merci pour votre soutien le long de la route, merci de nous avoir encouragé e de nous avoir poussez à montrer notre mieux.

On tient à remercier tous nos amis pour leur support et leur encouragement spécialement Sara et Meriem DJEMAI.

On tient à remercier tous ceux qui nous sont chères d'être dans notre vie, et de nous soutenir le long du chemin

Un grand merci à tous ceux qui ontcontribuéà ce travail de près ou de loin.

## Dédicace

*Je dédie ce travail*

*A mes parents,*

*Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Tout ce que j'ai accompli dans ma vie, c'est grâce à vous, à votre soutien, votre amour et vos sacrifices. Maman, Papa merci d'être la lumière dans ma vie, les étoiles de mon ciel je vous aime infiniment.*

*A celle qui m'est chère au cœur Maya, votre place sera toujours préservée dans mon cœur, merci d'être dans ma vie, merci d'être la lumière qui me guide dans les ténèbres, que Allah vous garde et vous protège.*

*A mes frères Khaled et Ilyes pour leurs disponibilités, leurs soutiens moral, leurs encouragements incessants et pour leurs compréhension.*

*A mon chère et unique sœur Ikram pour son sourire, son optimisme tu es et tu resteras ma petite princesse dans mes yeux.*

*A toute la famille BOUKERA ABBACI et HADJ DJILANI de près et de loin, un spéciale merci de votre soutien sans faille.*

*A mes amis Mohamed, Kamel et Abderrahman (El-Hadj) qui me sont proche du cœur vous êtes et vous serez toujours comme mes frères.*

*A mes collègues Sara et Meriem DJEMAI merci pour votre aide.*

*A tous ceux qui m'a appris un mot et à tous ceux qui ont sacrifié leur temps pour savoir et pour sauver les autres.*

*A tous les musulmans du monde que ce travail rapporte du bien à la nation de Mohamed*

*Somewhere inside you.*

**El-Abbaci**

## Dédicace

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que*



*Je dédie ce mémoire ...*

### *A MA TRÈS CHÈRE MÈRE KHEIRA*

*Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout à la longue vie.*

*Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices.*

*Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et Bonheurs.*

### *A Ma TRÈS CHÈRE SŒUR Amina*

*En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent, ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour.*

### *A MON TRÈS CHER FRÈRE ABDENACER*

*Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, Je te dédie ce travail. Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous tes vœux,*

*A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé*  
**ABDENOR,**

*Nesrine*

## Tables des matières

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Partie I : Etude bibliographique</b> .....	03
<b>Chapitre I : Etude de genre <i>Staphylococcus</i></b> .....	03
1. Définition.....	03
2. Historique .....	03
3. Habitat .....	04
4. Position taxonomique et classification .....	05
5. Caractères bactériologiques.....	08
5.1. Caractères morphologiques.....	08
5.2. Caractères cultureux .....	09
5.3. Caractères biochimique.....	10
6. Pouvoir pathogène .....	10
6.1 Définition .....	10
6.2. Chez l'homme .....	11
6.2.1. Infections nosocomiales .....	11
6.2.2. Infections cutanéomuqueuses .....	11
6.2.3. Infections systémiques .....	12
6.2.3.1. Septicémies .....	12
6.2.3.2. Endocardites .....	13
6.2.4. Toxi-infections alimentaires .....	13
6.3. Chez l'animal .....	14
6.3.1. Mammite Staphylococcique .....	15
7. Facteurs de virulence .....	16
7.1. Toxines .....	16
7.1.1. Toxine du syndrome de choc toxique ou TSST-1 .....	17
7.1.2. Entérotoxines .....	17
7.1.3. Exfoliatines .....	17
7.2. Protéines de surface ou facteurs d'adhérence (MSCRAMM) .....	17
<b>Chapitre II : les biofilms</b> .....	20
1. Généralités .....	20
2. Histoire de la formation de biofilm par les Staphylocoques.....	20

3. Définition et caractéristiques commune de biofilm .....	21
4. Formation de biofilm par les Staphylocoques .....	22
4.1. Mécanisme de formation d'un biofilm Staphylococcique .....	23
4.1.1. Adhésion .....	23
a. Adhésion aux surfaces abiotiques .....	23
b. Attachement aux surfaces biotiques.....	23
4.1.2. Multiplication des bactéries et maturation du biofilm .....	23
a. Adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) .....	24
b. Biosynthèse du PIA .....	24
4.1.3. Détachement du biofilm .....	25
4.2. Matrice de biofilm .....	26
4.3. Régulation moléculaire en biofilm chez les Staphylocoques .....	27
4.3.1. Système Accessory Gene Regulator (agr).....	27
4.3.2. Système sar (Staphylococcal Accessory gene Regulator) .....	28
4.4. Facteur favorisant la formation de biofilm .....	28
4.4.1. Caractéristiques de la surface .....	28
a. Type de surface .....	28
b. Rugosité de la surface .....	29
c. Propriétés physico-chimiques de la surface .....	29
d. Présence de films protéiques sur la surface .....	29
4.4.2. Caractéristiques du milieu .....	30
a. La température .....	30
b. Le pH.....	30
c. Sources de carbone disponibles.....	30
d. Concentrations en nutriments .....	30
e. concentrations en certain cation.....	31
f. Forces hydrodynamiques .....	31
4.4.3. Propriétés des cellules .....	31
a. Charge de la surface bactérienne .....	31
b. Caractère hydrophile/hydrophobe de la surface bactérienne .....	32
4.5. Prévention et élimination de biofilm .....	32
4.5.1. Inhibition de l'adhésion microbienne .....	32
a. Solutions verrous .....	32

b. Traitements par incorporation d'agents antimicrobiens .....	33
4.5.2. Traitement du biofilm Staphylococcique préformé .....	33
<b>Partie II :Matériel et Méthodes.....</b>	<b>34</b>
1. Méthodologie et contexte de l'étude.....	34
2. Matériels et Méthodes .....	35
2.1. Matériel biologique.....	35
2.1.1 Origine des souches .....	35
2.1.2 Isolement et identification des souches .....	35
2.1.3 Revivification et vérification de la pureté des souches .....	36
2.2 Matériel non biologique.....	37
3. Evaluation de la formation de biofilm in vitro.....	37
3.1 Méthode du Rouge Congo Agar .....	37
3.2 Méthode de culture sur microplaque (TCP) .....	37
4. Etude de l'effet de quelques facteurs sur la formation du biofilm.....	40
4.1 Choix des souches .....	40
4.2 Evaluation de l'effet de NaCl sur le pouvoir de formation du biofilm .....	41
4.3 Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne de <i>Staphylococcus</i> spp par la technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon ) .....	41
5. Evaluation de la capacité des souches à former le biofilm sur d'acier inoxydable.....	42
5.1 Nettoyage des lames d'acier inoxydable (inox).....	42
5.2 Essai d'obtention d'un biofilm expérimental .....	42
6. Analyses statistiques.....	43
<b>Partie III : Résultat et discussion.....</b>	<b>45</b>
1. Identification et revivification de souches utilisées .....	45
2. Résultats relative à l'étude de formation du biofilm.....	47
2.1. Résultats de la méthode de Rouge Congo Agar (RCA) .....	48
2.2. Résultats de la méthode de culture de tissu (TCP).....	52
3. Effet de NaCl sur la formation du biofilm par les <i>Staphylococcus</i> spp.....	56
4. Relation entre les gènes <i>icaA</i> , <i>icaC</i> , <i>icaD</i> et <i>bap</i> , et la formation de biofilm par les techniques RCA et TCP.....	59
4.1. Méthode TCP .....	60
4.2. Méthode RCA .....	61
5. Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne de <i>Staphylococcus</i> spp par la	

technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon).....	63
6. Evaluation de la capacité des souches à former le biofilm sur l'acier inoxydable.....	65
7. Relation entre les techniques TCP MATH et culture sur inox .....	65
Conclusion et recommandations .....	67
Références bibliographiques .....	68
Annexes	

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Présentation des espèces du genre <i>Staphylococcus</i> ( <b>Krieg and Manual, 1984</b> ).....	07
<b>Tableau 02</b> : Nombre et les origines des souches de Staphylocoque.....	35
<b>Tableau 03</b> : Classification de la formation de biofilm selon ( <b>Stepanović et al., 2007</b> ).....	39
<b>Tableau 04</b> : Les souches de <i>Staphylococcus</i> spp choisies, selon leurs potentiels de formation du biofilm.....	40
<b>Tableau 05</b> : Répartition des souches selon leur origine.....	45
<b>Tableau 06</b> : Répartition de taux de formation de Slime des souches selon leurs origines (Méthode RCA Rouge Congo).....	50
<b>Tableau 07</b> : Répartition de taux de formation de biofilm des souches selon leurs origines (Méthode TCP)... ..	55
<b>Tableau 08</b> : Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de Slime par les méthodes RCA et TCP (souches humaines).....	61
<b>Tableau 09</b> : Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de slime par les méthodes RCA et TCP (souches alimentaires).....	62
<b>Tableau 10</b> : Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de Slime par les méthodes RCA et TCP (souches mammites ovines).....	62
<b>Tableau 11</b> : Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de Slime par les méthodes RCA et TCP (souches mammites ovines) chez les SCN.....	63
<b>Tableau 12</b> : La relation entre l'hydrophobicité et la formation du biofilm sur microplaque et inox par les méthodes TCP MATH et Culture sur inox.....	67

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Observation microscopique des Staphylocoques (Spicer, 2003).....	08
<b>Figure 02</b> : Facteurs de virulence chez <i>Staphylococcus aureus</i> (Al Alam, 2008).....	16
<b>Figure 03</b> : Organisation structurale des protéines de surfaces de <i>S.aureus</i> (Jidar, 2007).....	18
<b>Figure 04</b> : Visualisation au microscope électronique à balayage de biofilms de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sur un implant intraoculaire (Baillif et al., 2010).....	21
<b>Figure 05</b> : Représentation schématique de la composition de biofilm (Goetz et al., 2016).....	22
<b>Figure 06</b> : Structure de l'adhésine polysaccharidique intracellulaire (PIA) (Mack et al., 1996).....	24
<b>Figure 07</b> : Biosynthèse de PIA chez <i>Staphylococcus</i> spp(Liesse Iyamba, 2012).....	25
<b>Figure 08</b> : Mécanisme de la formation de biofilm(Clutterbuck et al., 2007).....	28
<b>Figure 09</b> : Principe de la méthode TCP.....	38
<b>Figure 10</b> : Etapes de la méthode TCP.....	39
<b>Figure 11</b> : Etapes de la méthode MATH.....	42
<b>Figure 12</b> : Etapes de la méthode de culture sur l'acier inoxydable.....	43
<b>Figure 13</b> : Aspect des colonies des souches <i>Staphylococcus aureus</i> sur le milieu Baird Parker.....	46
<b>Figure 14</b> : Aspect des colonies des souches <i>Staphylococcus aureus</i> sur le milieu GN.....	47
<b>Figure 15</b> : Aspect des colonies des souches <i>Staphylococcus aureus</i> sur le milieu hypersalé au mannitol (Chapman) .....	47
<b>Figure 16</b> : Répartition des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> selon l'aspect des colonies sur le milieu RCA.....	48
<b>Figure 17</b> : Différents aspects des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> sur le milieu RCA.....	49
<b>Figure 18</b> : Formation du biofilm sur microplaque 96 puits (méthode TCP).....	53

<b>Figure 19:</b> Répartition des taux de formation de biofilm par les souches de Staphylocoques selon les valeurs moyennes de DO.....	54
<b>Figure 20:</b> Effet d'NaCl 2%, 6% sur la formation du biofilm par 14 souches de Staphylocoques sélectionnés. ....	57
<b>Figure 21 :</b> Pourcentage d'affinité des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> a l'héxadecane.....	64
<b>Figure 22 :</b> Potentiel de formation du biofilm sur acier inoxydable par les souches de <i>Staphylococcus spp</i> .....	65

## Liste des abréviations

**ADH** : Arginine- dihydrolase.  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.  
**Agr** : accessory gene regulator.  
**arIRS**: auto regulated locus  
**BHIB** :Brain –Heart Infusion Broth (Bouillon cœurcervelle).  
**C** : Cytosine.  
**C°** : Degré Celsius.  
**Clf** : protéine de liaison au fibrinogène.  
**Cm** :Centimètre.  
**CO2** :Dioxyde de carbone.  
**CSH %** : pourcentage d'adhésion au solvant.  
**DNase** :Désoxyribonucléase  
**DO** : Densité optique.  
**DOcn** : Densité optique du contrôle négatif  
**DOf** : Densité optique finale.  
**DOi** : Densité optique initiale.  
**Ebps** : proteine de liaison a l'elastine.  
**ECM** : Matrice extracellulaire  
**EDS** : Eau distillée stérile.  
**ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.  
**EnBP A/B** : protéine de liaison a la fibronectine A/B  
**EPS** : Exopolysaccharides.  
**ETA/B/D** : exfoliatine A/B/D  
**ETDA** : acide ethylene diamine tetraacetique.  
**g** : Gramme.  
**G** : Guanine.  
**g/l** : Gramme par litre.  
**GN** : Gélose nutritif.  
**h** : Heure  
**HNO3** : Acide nitrique.  
**ica** : inter cellular adhésion.  
**ISO** : organisation internationale de normalisation.  
**L** : Litre.  
**LPS** :Lipopolysaccharides.  
**MALDI-TOF-MS TOF**: Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight.  
**MATH** : Microbial Adhesion To Hydrocarbon.  
**min** : Minute.  
**ml** : Millilitre.  
**mm** : Millimètre.  
**MSCRAMM** : Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules.  
**NaCl** : Chlorure de sodium.

**NaOH** : Hydroxyde de sodium.

**NIH** : National Institute of Health.

**P1/2/3** : promoteur 1/2/3

**PBS** : Phosphate buffered saline.

**pH** : Potentiel hydrogéné.

**pKa** : constante de dissociation

**PNAG/PIA** : Polysaccharide intercellular adhesin.

**PSM** : phenol soluble modulins

**QS** : Quorum-Sensing.

**RCA**: Rouge Congo agar.

**rpm**: Revolution par minute.

**Sar**: Staphylococcal accessory regulator.

**SCN** : *Staphylococcus spp* à coagulase négative.

**Spa** : protéine A

**TCP** : Technique de culture sur microplaque.

**TSB**: Bouillon TryptoneSoja.

**TSST**: Toxine du Syndrome de choc Toxique.

**UDP-Glu-Nac** : Uridine diphosphate N-acétylglucosamine

**UI/ml** : unité internationale par millilitre

**µl** : Micro litre.

**µm** : Nanomètre.

**V/V** : Volume par volume.

**Souche S** : souche isolé à partir de Sheep

**Souche F** : souche isolé à partir de Food

**Souche M** : souche isolé à partir de Mammite

**Souche N** : souche isolé à partir d'écouvillonnage Nasal

**Résumé :**

Un biofilm est une communauté de micro-organisme qui s'adhère sur tissus vivants ou sur des surfaces inertes. Les Staphylocoques sont parmi les bactéries capable des former de biofilm. Le but de cette étude est de tester la capacité des souches de *Staphylococcus* spp à former un biofilm. Les souches de Staphylocoques ont été isolées des infections humaines et animales dans la région de Médéa et Ain defla. L'identification de souches a été fait par MALDI-TOF et les gènes *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap* responsables de formation de biofilm ont été recherché par technique puces à ADN. Deux méthodes ont été utilisées pour étudier la formation de biofilm, la méthode de plaque de culture de tissu (TCP) et la méthode de rouge Congo agar (RCA). L'hydrophobicité des souches et l'influence de la concentration de NaCl sur le processus de formation de biofilm ont été aussi évalués. Au total 62 souches (50 *S.aureus* et 12 souches SCN) ont été testées. Un taux de 56% des souches *S.aureus* et 41.67% des Staphylocoque à coagulase négatif étaient formatrices de slime selon la méthode RCA et 88.70% étaient formatrices de biofilm selon la méthode TCP. Les souches d'origine alimentaire presentent une forte aptitude de formation de biofilm (100%) par rapport autre souches. Les résultats obtenus de la méthode de MATH et culture sur inox montrent que l'hydrophobicité de la surface a un effet sur la formation du biofilm sur les surfaces abiotiques. Cette étude montre aussi que l'expression des gènes *icaA*, *icaC*, *icaD* portés par les Staphylocoques soient sous la dépendance de différents facteurs internes et externes.

**Mots clés :** Staphylocoques, biofilms, slime, RCA, TCP,

**Abstract :**

A biofilm defined as a community of micro-organism adheres to tissue or inert surfaces. Staphylococci are among the bacteria able to form biofilm. The purpose of this study is to evaluate the ability of *Staphylococcus* spp isolates to form a biofilm. The strains have been isolated from human and animal infections in the region of Medea and Ain defla. The identification of isolates was performed by MALDI-TOF, genes *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap* encoded for biofilm formation were detected by DNA microarrays. Two methods were used to test to biofilm formation, the tissue culture plate (TCP) method and Congo red agar (RCA) method. The hydrophobicity of isolates and the NaCl concentration effects on the biofilm formation process were also evaluated. In this study, a total of 62 isolates (50 *S.aureus* and 12 *Staphylococcus* coagulase négative strains) were used. The results indicate that 56% of *S.aureus* isolates and 41.67% of *Staphylococcus* coagulase negative were slime-forming according to the RCA method and 88.70% were biofilm-forming according to the TCP method. Food isolates present a high ability for biofilm formation (100%) compared to other isolates. The MATH and culture on stainless steel results show that the hydrophobicity of the surface has an effect on the biofilm formation on abiotic surfaces. This study shows also that the expression of the *icaA*, *icaC*, *icaD* genes carried by Staphylococci are on the dependence of various internal and external factors.

**Key words:** Staphylococci, biofilms, slime, RCA, TCP

## ملخص:

البيوفيلم هو مجتمع من الكائنات الحية الدقيقة تمتلك خاصية الالتصاق على الانسجة الحية والأسطح الغير الحية، المكورات العنقودية هي نوع من البكتيريا التي لها خاصية تكوين البيوفيلم . الهدف من هذه الدراسة هو تحديد امكانية انواع من المكورات العنقودية من تكوين البيوفيلم. تم عزل المكورات العنقودية من عينات أناس مصابين وحيوانات في ولايتي المدية و عين الدفلى. تم تحديد سلالة المكورات العنقودية عند طريق تقنية MALDI-TOF والبحث عن الجينات *bap*, *icaD*, *icaC*, *icaA* المسؤولة على تكوين البيوفيلم باستخدام تقنية شريحة ADN. قمنا باتباع تقنيتين لدراسة تكوين البيوفيلم، تقنية زراعة الانسجة TCP و تقنية أحمر الكونغو أجار RCA. تم ايضا متابعة تأثير كل من العوامل: اللا مائة و التركيزات المختلفة من كلوريد الصوديوم على انتاج البيوفيلم من طرف المكورات العنقودية. تمت التجربة على مجموع 62 نوع من العنقوديات منها، 50 نوع من المكورات العنقودية الذهبية و 12 نوع من المكورات العنقودية الغير مخثر للبلازما. حسب النتائج المتحصل عليها من تقنية احمر الكونغو أجار 56% من نوع المكورات العنقودية الذهبية و 41.67% من نوع المكورات العنقودية الغير مخثرة للبلازما قامت بتكوين مادة السلايم، اما حسب تقنية زراعة الانسجة ف 88.70% قامت بتكوين البيوفيلم بنسبة عالية، 100% من المكورات العنقوديات ذات الاصل الغذائي اظهرت طابع تكوين البيوفيلم مقارنة مع المكورات العنقودية من الاصول الاخرى، اظهرت النتائج المتحصل عليها من كل من تقنيات MATH و زراعة المكورات العنقودية على الحديد الغير القابل للصدأ ان لا مائة السطح لها تأثير على تكوين البيوفيلم على الاسطح الغير حية، هذه الدراسة بينت ان ترجمت الجينات *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap* تتأثر بعدة عوامل داخلية وخارجية.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية، البيوفيلم، السلايم، RCA، تقنية زراعة الانسجة TCP

## **Introduction**

L'idée que les bactéries croissent préférentiellement sur des surfaces a été avancée à intervalles réguliers au cours des 150 dernières années. Parallèlement, certains microbiologistes ont constaté au microscope optique que les bactéries planctoniques poussaient différemment après avoir adhéré à une surface et initié la formation d'un biofilm (**Kodjikian *et al*, 2005**).

Le biofilm bactérien est un mode de vie permettant aux bactéries de survivre dans un environnement hostile et cela grâce à une plus grande tolérance aux biocides et à la réponse immunitaire de l'hôte que les bactéries sous forme libre ou planctonique. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms peuvent causer des complications cliniques (**Goetz *et al*, 2016**).

L'organisation communautaire des biofilms permet aux cellules de coopérer et d'interagir de manière différente qu'en environnement libre. Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe, régulé par de nombreux facteurs exogènes et endogènes. Il est caractérisé par un changement radical phénotypique et génotypique (synthèse des gènes codent pour la formation de biofilm), et par l'acquisition de propriétés spécifiques aux biofilms, notamment l'acquisition d'une antibiorésistance et l'expression de facteurs de résistance à de nombreux stress environnementaux (**Lee *et al.*, 2015**).

Les infections bactériennes chez l'homme et les animaux causées par des bactéries associées à des biofilms constituent un véritable problème de santé publique (**Kodjikian *et al*, 2005**). Ces infections sont souvent liés à un certain nombre de facteurs tels que les pratiques de soins, la flore liée au patient ou encore l'environnement. Parmi les micro-organismes les plus incriminés dans ces infections les Staphylocoques qui occupe une place privilégiée. Le pouvoir pathogène ainsi que le caractère ubiquiste et l'absence d'exigences nutritionnelles font de cette bactérie un exemple d'adaptation et de dissémination surtout lors des ruptures de la barrière cutanée, ou l'immaturité du système immunitaire (Knobloch *et al.*, 2002).

Les Staphylocoques ont une aptitude à former des « biofilms » adhérant à des surfaces très diverses, avec une implication directe en pathologie humaine. Actuellement, il est considéré qu'environ 70% des infections chroniques animale et humaine sont en lien avec la formation de biofilm (**Bergon, 2016**).

La problématique des biofilms chez bactéries telle que les Staphylocoques ont été étudiés dans plusieurs publications dans le monde (Donlan, 2002), diverses méthodes ont été développées pour la détection et la quantification des biofilms (Deighton *et al.*, 2001; Harraghy *et al.*, 2006). En Algérie peu de publications ont se focalisé sur la recherche de formation de biofilm chez les Staphylocoques. Dans ce contexte, cette étude a été menée afin d'étudier le potentiel de formation des biofilms par des souches *Staphylococcus* spp isolées des infections animales et humaines, avec une exploration sur facteurs qui peuvent influencer ce processus. L'hydrophobicité de la surface cellulaire ainsi que l'adhésion bactérienne à l'acier inoxydable ont été aussi évalués.

Ce travail comporte trois grandes parties :

- I. Une mise au point bibliographique permet d'étudier et de caractériser le genre *Staphylococcus* et traiter les connaissances actuelles sur les biofilms.
- II. Une partie pratique comprenant : la mise au point d'une collection des souches *Staphylococcus* spp isolées des infections animales et humaines, développer le matériel et méthodes utilisés pour la détection de la capacité de ces souches à former les biofilms.
- III. Une troisième partie rend compte des résultats expérimentaux obtenus. Enfin, nous présenterons une principale conclusion et quelques perspectives de ce travail.

## **Partie I : Etude bibliographique :**

### **Chapitre I : Etude de genre *Staphylococcus***

#### **1. Définition :**

Les Staphylocoques sont des germes ubiquitaires et commensaux(David, 2010),ils représentent près de 50% des bactéries aérobies isolées sur la tête, les aisselles, les bras, les jambes et dans les narines. Ils jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière contre les bactéries de la flore transitaire. Leurs distributions sur la peau n'est pas uniforme. Il existe des niches préférentielles qui témoignent d'une adaptation de certaines espèces aux différentes régions de la peau(Morot-Bizot, 2006).

#### **2. Historique :**

Les premières descriptions des Staphylocoques (bactéries en forme de coques) isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871 mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine (Fasquelle, 1974; Sambanthamoorthy, 2007).

Plus tard ; en 1883, Ogston a été le premier auteur à différencier deux types de coques pyogènes: un premier groupe arrangé en groupe ou amas appelé « *Staphylococcus* » et un second groupe organisé en chaîne nommé « *Streptococcus*» (Berche et al., 1988; Spicer,2003; Gillespie and Hawkey, 2006).

En 1884, en Allemagne, Anton Julius Friedrich Rosenbach donne la première description du genre *Staphylococcus* en cultivant les bactéries sur milieu solide. Il différencie ainsi *S.aureus* de *S.albus* par la coloration des pigments produits par les colonies(Hennekinne, 2009).

En 1885, Zopf a placé les Staphylocoques et les Microcoques dans le genre *Micrococcus*. Puis séparés par la suite par Flugge, Evans, Bradford et Niven(1955) qui classent les cocci anaérobies facultatifs et aérobies dans le genre *Staphylococcus* et *Micrococcus*, respectivement. Cette classification est basée sur leur action vis-à-vis de la gélatine et le test d'oxydation –fermentation du glucose.(Baird-Parker, 1965)

Une nette distinction basée sur la composition de l'ADN entre les deux genres a été proposée par Silvestri et Hillen (1965). Le pourcentage en bases G+C de l'ADN des

Microcoques est de 63-73% comparé à celui des Staphylocoques 30-39%. Indiquant qu'il n'existe pas de relation entre les deux genres(**Hawkey, 2006**).

### **3. Habitat :**

Il s'agit des germes ubiquitaires, les Staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux(**NAGASE et al., 2002; Quinn et al., 2011**).

Chez l'homme, les Staphylocoques en particulier les espèces *S.aureus* et *S.epidermidis* font partie de la flore résidente cutanée de nombreux individus qui sont des porteurs asymptomatiques».

Ils jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière de colonisation, empêchant l'implantation de bactéries de la flore(**Wylie and Nowicki, 2005**).

Cependant, l'habitat préférentiel de *S.aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. Il existe trois statuts de portage nasal de *S.aureus*: Environ 20% de la population est porteuse de manière permanente (porteurs persistants), environ 60% sont porteurs de manière intermittente, avec des souches qui varient au cours du temps, et 20% ne sont pratiquement jamais porteurs (**Eveillard, 2007**). La distinction entre porteurs permanents et intermittents est importante. En effet, les porteurs permanents ont une densité bactérienne plus élevée et un risque plus important d'infection. De plus, les techniques de typage moléculaire ont montré que les porteurs persistants sont souvent colonisés avec la même souche alors que les porteurs intermittents sont colonisés, à différents moments, avec des souches génétiquement différentes (**VandenBergh et al., 1999**).

Les mécanismes impliqués dans le portage nasal sont encore mal compris. Ils font intervenir des facteurs liés à l'hôte, des facteurs bactériens et des facteurs environnementaux (**Kluytmans et al., 1997; Nouwen et al., 2001**).

Les souches de *S.aureus* sont présentes également sur les membranes muqueuses du tractus respiratoire ainsi que le tractus urogénital et comme flore transitoire dans le tractus digestif (**Quinn et al., 2011**). Ces bactéries survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions hostiles de l'environnement, tels que la dessiccation (ils survivent plusieurs mois dans des produits pathologiques desséchés), aux variations de température. (ils

résistent 2 h à 55° C, voire 1 h à 60° C), au choc osmotique (salinité de l'eau) et résistent encore mieux en milieux albumineux (**Berche et al., 1988**).

Ils sont largement disséminés dans l'environnement, retrouvés dans le sol, les poussières (l'air), l'eau et dans certains produits alimentaires (laitages, conserves salées) (**Homkong et al., 2017**).

Comme chez l'homme, les Staphylocoques retrouvés chez les animaux ont pour habitat principal la peau et les muqueuses. Néanmoins, les espèces de Staphylocoques hébergées chez les animaux ne sont pas tout le temps retrouvées chez l'homme (**Götz et al., 2006**).

Parmi les Staphylocoques retrouvés chez les animaux, *S.intermedius* est isolé chez de nombreuses espèces. Ce Staphylocoque a comme hôte préférentiel, le chien, et c'est la principale bactérie isolée de la peau et des muqueuses de ces animaux. Chez le chat, *S.intermedius* n'est pas une bactérie fréquente mais elle peut être isolée des poils et plus rarement des muqueuses comme *S.intermedius*, *S.felis* peut être isolé chez le chien et le chat. Cependant, chez le chat, cette espèce constitue le Staphylocoque le plus abondant et représente une des principales bactéries des flores cutanée et orale de ces animaux. *S.hyicus*, *S.chromogenes*, *S.sciuri*, *S.lentus* et *S.vitulus* sont, quant à eux, des résidents communs des ongulés (bovins, caprins, équins...). De plus, les trois dernières espèces sont aussi des résidents communs des baleines et des mammifères aquatiques apparentés (**Götz et al., 2006**).

Certains Staphylocoques humains se retrouvent également comme bactéries résidentes ou transitoires chez les animaux domestiques. Par exemple, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* et *S.warneri* peuvent se retrouver occasionnellement sur les animaux domestiques mais ces bactéries sont probablement transférées à partir de leurs maîtres (**Götz et al., 2006**).

#### **4. Position taxonomique et classification :**

Selon la classification de **Garrity et al (2007)**: Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes constitué de quatre classes : Clostridia, Mollicutes, Bacilli, Togobacteria. La classe des Bacilli est constituée de deux ordres: Bacillales et Lactobacillales, dont chacun est divisé en quatre familles; *Staphylococcaceae* constitue la 4ème famille des Bacillales, celle-ci comprend un seul genre: *Staphylococcus* (GC% 30-39%). Le genre *Staphylococcus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animale.

La taxonomie du genre *Staphylococcus* a subi plusieurs remaniements successifs grâce au développement du séquençage d'ARNr 16S, on distingue plus de quarante espèces de *Staphylococcus* dont 24 sous espèces comme il est indiqué dans le (Tableau 1) (Alomar, 2007). Un certain nombre d'entre elles sont trouvées chez l'homme, d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (viandes, produits laitiers, etc...)(Avril *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2011).

Parmi les espèces retrouvées chez l'homme, trois espèces occupent une place privilégiée *S.aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*, les autres sont rarement impliquées en pathologie humaine. Le genre *Staphylococcus* est séparé en deux groupes sur la base de la présence de la coagulase(Alomar, 2007).

Le groupe des Staphylocoques à coagulase négative avec 33 espèces dont la majorité ne présente pas de risque sanitaire telles que *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* isolés de lait ou de fromage (Morea *et al.*,1999; Blaiotta *et al.*, 2004);.D'autres espèces telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* sont impliquées dans les infections nosocomiales(Freney *et al.*, 1999).

Le groupe des *Staphylococcus* à coagulase positive est constitué de 7 espèces identifiées à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi*. Celles-ci peuvent être impliquées dans des infections humaines(Avril *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2011).

Il existe plusieurs types de classification de *S.aureus* dont la plus utilisé est la classification de Bergey(Delarras, 2007).

. **Domaine** : Bacteria ou Eubacteria.

.**Phylum XIII** : Firmicutes.

.**Classe** : Bacilli.

.**Ordre** : *Bacillales*.

. **Familles** : *Staphylococcaceae*.

.**Genre** : *Staphylococcus*.

.**Espèce** : *Staphylococcus aureus*.

**Tableau 1** : Présentation des espèces du genre *Staphylococcus* (Krieg and Manual, 1984).

Espèces	présence en produits alimentaires	Risque ou intérêt
<b>Staphylococcus a coagulase positive</b>		
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	Lait, fromage, viande	Pathogène
<i>S. aureus subsp. aureus</i>		
<i>S. delphini</i>		
<i>S. hyicus subsp. chromogenes</i>		
<i>S. hyicus subsp. hyicus</i>		
<i>S. intermedius</i>		
<i>S. lutrae</i>		
<i>S. pseudintermedius</i>		
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>		
<i>S. schleiferi subsp. schleiferi</i>		
<b>Staphylococcus coagulase négative</b>		
<i>S. arlettae</i>	Lait	
<i>S. auricularis</i>	Lait, fromage, viande	
<i>S. capitatus subsp. capitatus</i>	Lait, viande	
<i>S. capitatus subsp. urealyticus</i>	Lait	
<i>S. caprae</i>	Lait, viande	
<i>S. carnosus subsp. carnosus</i>	Saucisson, Mozzarella	Ferment
<i>S. carnosus subsp. utilis</i>	Lait	
<i>S. caseolyticus</i>		
<i>S. chromogenes</i>		
<i>S. cohnii subsp. cohnii</i>	Lait, fromage	
<i>S. colmi subsp. urealyticus</i>		
<i>S. condimenti</i>		
<i>S. epidermidis</i>	Lait, fromage, Saucisson	Ferment
<i>S. equorum subsp. equorum</i>	Lait, fromage, Saucisson	
<i>S. equorum subsp. plinens</i>	Lait, fromage	
<i>S. felis</i>		
<i>S. fleurettii</i>	Lait, fromage	
<i>S. gallinarum</i>	fromage	
<i>S. haemolyticus</i>	Lait, viande	
<i>S. hominis subsp. hominis</i>	Lait	
<i>S. hominis subsp. novobiosepticus</i>		
<i>S. kloosii</i>		
<i>S. lentus</i>	Lait, fromage	
<i>S. lugdunensis</i>	Lait	
<i>S. muscae</i>		
<i>S. nepalensis</i>		
<i>S. pasteurii</i>	Saucisson	
<i>S. piscifermentans</i>	Poisson	
<i>S. pulvereri</i>	Saucisson	
<i>S. saccharolyticus</i>		
<i>S. saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	Lait, fromage, Saucisson	
<i>S. saprophyticus subsp. bovis</i>		
<i>S. sciuri subsp. sciuri</i>	Lait	
<i>S. sciuri subsp. carnaticus</i>	Lait, fromage	
<i>S. sciuri subsp. rodentium</i>		
<i>S. sciuri subsp. lentus</i>	Lait	
<i>S. simiae</i>		
<i>S. simulans</i>	Lait	
<i>S. succinus subsp. casei</i>		
<i>S. succinus subsp. succinus</i>	Saucisson	
<i>S. vitulinus</i>	Saucisson	
<i>S. warneri</i>	Lait, Saucisson	
<i>S. wylosus</i>	Lait, fromage, viande, saucisson	Ferment

## 5. Caractères bactériologiques :

### 5.1. Caractères morphologiques :

A partir des tests biochimiques et la forme des colonies, le genre *Staphylococcus* peuvent être identifiés. Les Staphylocoques sont donc des cocci à Gram positif sphériques de 0,5 à 2,5µm (Trouillet, 2011), isolées ou groupées en amas de plusieurs élément réalisant la disposition en grappe de raisin, ce sont des cocci qui mesurent 0,8 à 1 µm de diamètre, immobiles, sporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule. Les Staphylocoques sont généralement différenciés en deux groupes sur la base de leurs capacités à produire une coagulase libre, les Staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus*) ont un pouvoir pathogène bien démontré par rapport au groupe des Staphylocoques à coagulase négative qui sont considérés comme pas ou peu pathogènes (Nauciel and Vildé, 2005).

Ils se disposent en amas irréguliers polyédrique évoquant l'aspect caractéristique de grappe de raisin (Ananthanarayan, 2006). Parfois, ils présentent l'aspect en diplocoques, en tétrades ou en très courts chainettes (en générale de 3 à 5 éléments) (Le Loir *et al.*, 2003).



**Figure 1 :** Observation microscopique des Staphylocoques (Spicer, 2003).

## 5.2. Caractères culturels :

Les Staphylocoques se développent en aérobiose ou en anaérobiose sur la plupart des milieux usuels. Certaines souches nécessitent cependant une forte pression en CO<sub>2</sub> pour une croissance optimale ainsi que la présence d'autres métabolites tels que l'hémine ou la ménadione. La température optimale de croissance est de 30°C à 45°C avec un optimum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5 (**Spicer, 2003**).

En gélose nutritive : on obtient des colonies arrondies, bombées, luisantes, opaques, à contours nets, pigmentées après 24 à 36 heures pouvant alors présenter une coloration jaune-doré parfois jaune citrin par *S.aureus* (par opposition aux autres Staphylocoques dits "blancs"). En bouillon nutritif : On observe en 24h, un trouble uniforme abondant, puis un dépôt d'un voile pelliculaire en surface.

- ✓ En milieu Chapman : (milieu hyper salin à 75 g/l de NaCl, mannitol comme substrat pour caractère différentiel) à 37°C pendant 24 heures, les colonies apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté sinon les colonies sont de couleur blanche, régulièrement rondes lisses, l'utilisation du milieu de culture sélectif hyper-salé de Chapman pour isoler le Staphylocoque d'un prélèvement poly-microbien.
- ✓ En milieu gélose au sang frais : on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (bêta hémolyse) autour des colonies. Ceci est lié au fait que certains Staphylocoques, en particulier *S.aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre, et dont l'activité diffère selon le type d'hématies en cause.
- ✓ En gélose au sang cuit : les colonies ont une couleur blanche ou jaune pigmenté.

La plupart des souches de Staphylocoques poussent sur un milieu synthétique contenant entre autre du glucose, des sels minéraux, 14 acides aminés dont la cystéine, la vitamine B1 et l'acide nicotinique (**Couderc et al., 2014**).

Pour isoler et caractériser le Staphylocoque, le milieu de Baird Parker est utilisé. Il est à base de téllurite comme agent sélecteur, enrichi en glycine, en pyruvate et en jaune d'œuf. Il faut noter que les milieux sélectifs ne conviennent pas pour isoler les Staphylocoques de l'air (**Le Minor and Veron, 1990**).

### 5.3. Caractères biochimique :

Les caractères biochimiques des Staphylocoques permettent non seulement d'identifier le genre *Staphylococcus*, mais encore de distinguer un Staphylocoque potentiellement pathogène (*S.aureus*) d'une souche saprophyte (*S.epidermidis* au *S.saprophyticus*).

1- Caractères utiles pour l'identification de genre *Staphylococcus* parmi ceux-ci, retiennent particulièrement l'attention:

**a- Catalase :** Toujours positive (+) et oxydase négative (-).

**b- Coagulase:** la mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *Staphylococcus aureus* peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie et d'autre espèce de genre *Staphylococcus* à coagulase négative (*S.epidermidis* et *S.saprophyticus*) (Couderc *et al.*, 2014).

**c- Arginine- dihydrolase (ADH) :** Cette recherche, réalisée en anaérobiose, sur bouillon de Moeller+arginine, donne un résultat positif en moins de 96 heures pour les souches appartenant au genre *Staphylococcus*.

**d-fermentation de nombreux hydrates de carbone:** Glucose, saccharose, glycérol...etc., sont fermentés; le xylose n'est jamais fermenté.

**e- Recherche désoxyribonucléase :** La désoxyribonucléase est une diastase sécrétée par un certain nombre d'espèces microbiennes (levures, moisissures) et en particulier par les Staphylocoques pathogènes (Wechman and Catlin, 1957; Fusillo and Weiss, 1959).

**f- fermentation du mannitol :** Cette fermentation est un test clé pour une orientation vers *S.aureus*(KRIDECH and BEN BLIDIA, 2016).

## 6. Pouvoir pathogène :

### 6.1 Définition :

Le pouvoir pathogène se définit comme l'aptitude de ce germe (*Staphylococcus*) à provoquer des troubles dans un organisme, soit par virulence, soit par toxinogénèse, soit par l'association de ces deux mécanismes (Grünfeld, 1994).

## **6.2. Chez l'homme :**

Les Staphylocoques sont responsables d'une pléthore de problèmes médicaux, comprenant les infections cutanées et des tissus mous, les infections des sites opératoires, ainsi que les endocardites et les septicémies acquises à l'hôpital. Un nombre croissant d'infections sont liées à l'évolution des pratiques médicales (utilisation de prothèses et de cathéters, ainsi que d'immunosuppresseurs)(**Klein et al., 2007; Biedenbach and Jones, 2009; Koksall et al., 2009; Otto, 2009; Morad Asaad et al., 2016**).

### **6.2.1. Infections nosocomiales :**

L'espèce de Staphylocoque à coagulase positive, *S.aureus*, est une cause majeure d'infections communautaires et nosocomiales (**Bannerman, 2007**). *S.aureus* est responsable d'un large éventail d'infections graves, avec des taux de morbidité et de mortalité pouvant atteindre 64% en fonction du site de l'infection. Ce pathogène est capable de produire une variété de toxines et de s'attacher solidement à du matériel prothétique par la production d'un glycocalyx(**Morad Asaad et al., 2016**).

Bien que les Staphylocoques constituent une composante majeure de la microflore normale de l'homme, leur rôle dans les infections nosocomiales a été reconnu et bien documenté au cours des deux dernières décennies. L'augmentation des infections par ces organismes a été corrélée avec l'usage d'appareils médicaux et le nombre croissant de patients immunodéprimés en milieu hospitalier. Le processus infectieux peut résulter de l'introduction de Staphylocoques endogènes au-delà des barrières tégumentaires normales. Parmi ces espèces, *S.epidermidis* est la plus fréquemment rencontrée dans les infections cliniques chez l'homme, suivie par l'espèce *S.haemolyticus*(**Irlinger, 2008**).

### **6.2.2. Infections cutané-muqueuses :**

Les infections de la peau et des muqueuses causées par les Staphylocoques sont favorisées par des facteurs locaux ou généraux. Toute lésion, même minime du revêtement cutané (excoriations, traumatismes, blessures, brûlures, piqûres, incisions chirurgicales...) permet une colonisation des tissus par les souches de Staphylocoques provenant de la peau (**Koksall et al., 2009**). Il faut insister sur la gravité des infections dues aux Staphylocoques chez les sujets aux défenses immunitaires amoindries : immunodépression acquise (virale, chimiothérapie) ou congénitale, ou encore malades atteints d'affections chroniques (diabète, mucoviscidose, cancer, alcoolisme, insuffisance rénale chronique) (**Götz et al., 2006**).

*S.aureus* est la principale espèce de Staphylocoque impliquée dans les infections cutanéomuqueuses. Les infections cutanées à *S.aureus* sont des folliculites, des furoncles et des impétigos (surtout chez l'enfant). *S.aureus* est aussi responsable d'infections des muqueuses, telles que les conjonctivites, les infections génitales (salpingites) et les infections des voies aériennes supérieures (sinusites, otites, mastoïdites, infections pulmonaires) (**Götz et al., 2006**).

### **6.2.3. Infections systémiques :**

#### **6.2.3.1. Septicémies :**

Les septicémies sont la conséquence de la dissémination des germes à partir d'un foyer localisé et peuvent survenir chez les personnes non immunodéprimées. Les septicémies sont favorisées par des traumatismes locaux, des corps étrangers (cathéters, sondes, interventions chirurgicales, brûlures étendues, traumatismes vasculaires répétés). Parmi les septicémies occasionnées par les Staphylocoques, deux tiers des cas présentent une infection sous-jacente (diabète, insuffisance rénale chronique, leucose, cancer, hépatite chronique, immunodépression). Il faut noter la fréquence des métastases septiques (poumons, rate, foie, cerveau, reins, muscles, os, articulations, endothélium vasculaire, séreuses). De plus, il est possible que l'infection évolue vers une chronicité (ostéite...) ce qui pose des problèmes thérapeutiques (**Casey et al., 2007**).

Les manifestations de la septicémie peuvent être divisées en maladies médiées par des toxines (empoisonnement alimentaire, syndrome de la peau ébouillantée, syndrome du choc toxique), en infections de la peau et des tissus mous (furoncles, cellulites et impetigo), en infections de sites profonds (os, jointures, valve du cœur, rate et foie...) et en infections des poumons et du tractus urinaire. Une complication importante de la septicémie à *S.aureus* est la dissémination de cet organisme à un ou plusieurs sites distants. Des manifestations supplémentaires de l'infection acquise à l'hôpital incluent l'infection des plaies chirurgicales, la pneumonie associée à la ventilation, la septicémie associée aux appareils intraveineux et l'infection associée avec d'autres types de prothèses (**Götz et al., 2006**).

La septicémie à *S.aureus* est le fléau majeur des soins médicaux modernes. Autour des deux tiers des cas sont reliés aux infections nosocomiales, la plupart d'entre elles sont associées à l'usage de matériel intraveineux (**Bannerman, 2007**). Un des plus grands défis qui se posent dans les soins aux personnes atteintes par *S.aureus* est de déterminer si la maladie

est associée à une dissémination bactérienne impliquant un ou plusieurs sites distants. Les sites les plus communs d'infections profondes comportent les os, les jointures et les valves cardiaques (**Bannerman, 2007**).

Au cours des dernières décennies, l'implication des Staphylocoques à coagulase négative comme cause de septicémie a augmenté. Cela coïncide avec les progrès de la pratique médicale, comme l'utilisation accrue des dispositifs médicaux (cathéters vasculaires, prothèses articulaires, greffes vasculaires, prothèses valvulaires cardiaques et cathéters péritonéaux), ainsi qu'avec le nombre croissant de patients immunodéprimés (**Ruhe et al., 2004**).

Les principales espèces de Staphylocoques à coagulase négative, impliquées dans les septicémies, sont *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* et *S.lugdunensis*(**Ruhe et al., 2004; Götz et al., 2006;Bannerman, 2007**).

#### **6.2.3.2. Endocardites :**

Les Staphylocoques à coagulase négative sont maintenant reconnus comme étant des agents pathogéniques responsables des endocardites sur les prothèses valvulaires et sur les valves natives, en particulier du côté droit chez les toxicomanes par voie intraveineuse(**Casey et al., 2007; Piette and Verschraegen, 2009**).

Parmi les espèces de Staphylocoques *S.lugdunensis* a été rapporté comme une cause importante d'endocardites. La nature agressive de l'endocardite par *S.lugdunensis*, comme le reflète la nécessité fréquente d'un remplacement valvulaire et le haut taux de mortalité, indique que l'identification rapide de *S.lugdunensis* est nécessaire (**Freney et al., 1988; Hájek et al., 1996; Ebright et al., 2004;Bannerman, 2007**).

*S.aureus* est également une cause notable d'endocardite à la fois sur les valves natives et prothétiques (**Casey et al., 2007**). Les taux d'endocardites par *S.aureus* ont augmenté, durant les dernières années, avec l'usage de cathéters intraveineux. Comme les septicémies, les endocardites Staphylococciques sont particulièrement graves (**Casey et al., 2007**).

#### **6.2.4. Toxi-infections alimentaires :**

Les toxi-infections alimentaires dues aux Staphylocoques résultent de l'ingestion d'entérotoxines Staphylococciques à partir d'aliments contaminés (produits laitiers, viandes). La contamination de l'aliment est presque exclusivement due à une mauvaise manipulation de

l'aliment par des porteurs sains ne respectant pas les exigences d'hygiène. L'intoxication est caractérisée par une incubation courte (1 à 6 heures après ingestion), des crampes abdominales douloureuses, des diarrhées, des vomissements et l'absence de fièvre. L'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement mais la survenue de choc toxique Staphylococcique est possible lors d'une intoxication massive (Götz *et al.*, 2006).

*S.aureus* a été confirmé comme étant l'agent causal dans de nombreux cas toxi-infections graves. En fonction des études, les intoxications alimentaires à *S.aureus* représenteraient 15 à 30% des toxi-infections alimentaires. Sa présence dans les aliments est donc une préoccupation majeure (Götz *et al.*, 2006).

Bien que les quantités d'entérotoxines excrétées par les souches de *S.intermedius* soient faibles en comparaison de celles excrétées par les souches entérotoxigènes de *S.aureus* sub sp *aureus* ; une fois introduite dans un aliment, une souche de *S.intermedius* peut proliférer et excréter suffisamment d'entérotoxines pour être à l'origine d'une toxi-infection alimentaire. D'ailleurs, une épidémie de toxi-infection alimentaire, due à une souche de *S.intermedius* produisant une entérotoxine A, a été décrite en 1991 en Californie et au Nevada. Cette épidémie, qui a concerné 265 individus, résultait de l'ingestion de margarine et de beurre contaminés. Cette épidémie d'intoxication alimentaire suggère que l'homme au contact d'un chien puisse être porteur de souches entérotoxigènes et contaminer les aliments (Götz *et al.*, 2006).

### 6.3. Chez l'animal :

Les Staphylocoques sont des pathogènes majeurs chez les animaux. Les espèces *S.intermedius*, *S.hyicus* et *S.aureus* sont d'une importance particulière dans les infections animales (Götz *et al.*, 2006; Bannerman, 2007). *S.intermedius* est tout particulièrement associée à une variété d'infections cutanéomuqueuses canines. Chez les chats, les infections cutanées causées par cette bactérie sont comparables à celles du chien mais l'espèce *S.intermedius* est moins fréquemment isolée que les espèces *S.aureus* sub sp. *aureus* ou que *S.felis*. *S.hyicus* est aussi responsable de nombreuses infections chez diverses espèces animales.

Chez le porc, *S.hyicus* est responsable d'arthrites (notamment chez les porcs âgés de moins de 6 semaines), d'avortements, de métrites et de vaginites. Tandis que chez les chevaux et les chats, *S.hyicusest* à l'origine de diverses lésions cutanées. Chez les bovins, la principale

infection est la mammite Staphylococcique (**Chiang et al., 2008**). Cette infection peut avoir des conséquences économiques considérables dans l'industrie laitière et peut être causée par une variété de Staphylocoques (*S.aureus*, *S.hyicus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*, *S.simulons*, *S.chromogenes*, *S.intermedius*, *S.sciuri*...).

### **6.3.1. Mammite Staphylococcique :**

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à gram positif vivant à la surface de la peau. On retrouve cette bactérie à la surface de la peau de la mamelle et des trayons. En cas de contamination de la mamelle, on peut également la retrouver dans le parenchyme. Ce germe est connu pour sa forte contagiosité. En effet, cette bactérie se transmet principalement pendant la traite et son caractère contagieux s'explique par le fait qu'une vache infectée contamine les vaches saines par l'intermédiaire du manchon trayeur, de remontées de lait ou par l'intermédiaire des mains du trayeur (principalement par des mains crevassées) (**Rémy, 2010**).

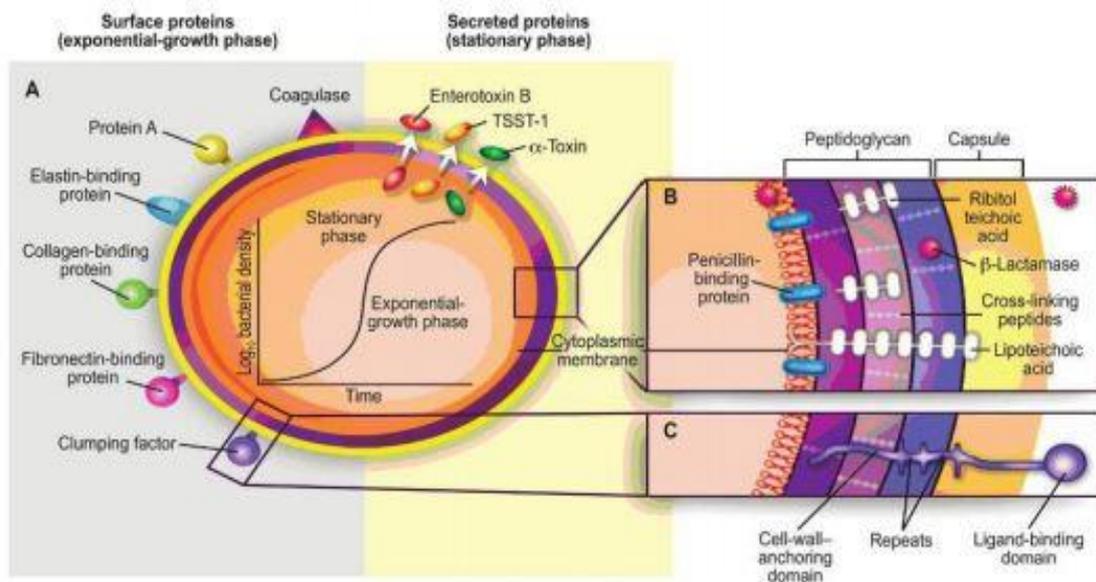
En présence d'infection à *Staphylococcus aureus*, l'augmentation du nombre de quartiers infectés dans l'élevage est rapide, mais il faut tout de même savoir que, dans de plus rares cas, les infections à *Staphylococcus aureus* sont peu contagieuses (**Sommerhäuser et al., 2003**), *Staphylococcus aureus* a le pouvoir de pénétrer profondément dans la mamelle grâce à un équipement enzymatique performant, il peut alors s'enkyster dans le tissu mammaire. Cette bactérie a la capacité de se mettre à l'abri dans des micro-abcès et dans les cellules (**Rémy, 2010**). Ces propriétés lui permettent de résister aux attaques du système immunitaire et de s'isoler derrière la paroi des abcès qui empêche la pénétration des antibiotiques (**DESCOTEAUX, 2004**). Ce germe est ainsi assez résistant aux traitements. Les rechutes sont donc fréquentes. Ainsi, la réussite d'un traitement dépend de sa durée, de la réalisation d'un traitement ou non par voie générale, de l'âge de l'animal, des mesures d'hygiène prises pour réaliser le traitement local et du moment du traitement. L'efficacité du traitement en lactation est faible, elle est meilleure au tarissement. Ce faible taux de réussite du traitement est souvent à l'origine d'une réforme des animaux (**Hanzen, 2009**). Une infection à *Staphylococcus aureus* se manifeste par des cas cliniques peu sévères ou discrets, rencontrés sur toute la lactation, survenant surtout chez des vaches ayant déjà des concentrations cellulaires somatiques élevées qui persistent plusieurs mois après l'épisode clinique (**Seegers and Sérieys, 2002**). Ces germes sont plus fréquemment à l'origine de

mammites subcliniques et chroniques, rendant leur diagnostic et leur contrôle difficile (Wallemacq *et al.*, 2010).

## 7. Facteurs de virulence :

Les facteurs de virulence identifiés sont nombreux chez les Staphylocoques. Ils sont codés par des gènes localisés sur le chromosome ou sur les éléments génétiques mobiles (Figure 2) (Fomba, 2006). Ces facteurs codent pour des protéines de surface ou des exo-protéines et permettent à la bactérie de combattre le système immunitaire, d'adhérer aux cellules, de se disséminer dans le corps mais aussi d'utiliser les nutriments et l'énergie disponible (Chevalier, 2009).

Les Staphylocoques ont aussi des facultés d'adhésion aux structures inertes (corps étrangers, prothèses) et de production d'un biofilm qui est le principal facteur de virulence de ces bactéries (Al Alam, 2008).



**Figure 02** : Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* (Al Alam, 2008).

### 7.1. Toxines :

Les Staphylocoques sécrètent une quantité impressionnante de toxines et d'enzymes hydrolysant différents constituants cellulaires. Ces toxines et enzymes extracellulaires contribuent à la pathogénie des Staphylocoques (Bisognano, 2001).

### **7.1.1. Toxine du syndrome de choc toxique ou TSST-1 :**

Elle appartient aux exotoxines super antigéniques, elle entraîne un choc toxique Staphylococcique (**Fomba, 2006**).

### **7.1.2. Entérotoxines :**

Elles sont au nombre de 18, possèdent les mêmes propriétés super antigénique que la TSST-1 et potentiellement responsable du choc toxique Staphylococcique, sept d'entre elles sont responsables de toxi-infections alimentaires (**Hennekinne, 2009**).

Une souche de Staphylocoques peut produire deux ou trois types d'entérotoxines en même temps (**Balaban and Rasooly, 2000**). La quantité de toxine produite peut être très variable (**Bourgeois et al., 1996**).

### **7.1.3. Exfoliatines :**

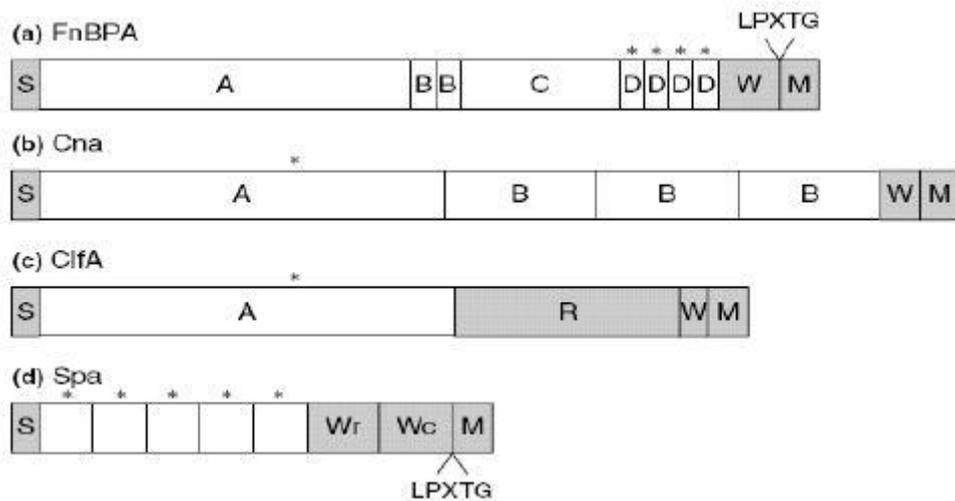
Sont en nombre de trois A, B et C. Ce sont des toxines épidermolytiques impliqués dans l'épidermolyse bulleuse Staphylococcique (**Bailey et al., 1995**).

Il existe trois types d'exfoliatines : l'exfoliatine A (ETA) codée par le gène *eta*, l'exfoliatine B (ETB) codée par le gène *etb* et l'exfoliatine D (ETD) codée par le gène *etd*. Elles clivent la desmogléine-1 reliant les cellules granuleuses de l'épiderme, ce qui induit l'apparition d'un décollement intra-épidermique spécifique (**Ladhani, 2003**).

## **7.2. Protéines de surface ou facteurs d'adhérence (MSCRAMM) :**

Les protéines de surface jouent un rôle dans la capacité du Staphylocoque à coloniser les tissus en se fixant aux cellules et à la matrice extracellulaire. Ces composés de surface servent de récepteurs aux protéines du plasma adsorbées à la surface du matériel médical (cathéters, prothèses...) expliquant ainsi la colonisation par les Staphylocoques. La formation de biofilm se produit aussi lors de l'infection de tissus par l'adhésion bactérienne aux molécules de la matrice extracellulaire de l'hôte (**Planchon, 2006**).

Ces protéines agissent comme des andésines en fixant le collagène (Cna), la fibronectine (FnBP A et B), le fibrinogène (clumping factor A et B) et l'élastine (Ebps). Elles portent de manière plus général le nom de « **Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules** » (MSCRAMM), elles sont solidement ancrées au peptidoglycane (Figure 3) (**Jidar, 2007**).



**Figure 3** : Organisation structurale des protéines de surfaces de *S.aureus*(**Jidar, 2007**).

**S** : séquence signal ; **R** : répétition du péptide Ser-Asp ; **W** : région traversant la paroi bactérienne ; **M** : région d'ancrage à la membrane et contenant des résidus chargés positivement ; **A** et **C** : domaines uniques, **B** et **D** : domaine répétés, les astérisques indiquent les domaines peptidiques de liaison au récepteur.

✓ **Protéine A (Spa) :**

La protéine A est la protéine de surface bactérienne la mieux caractérisée. Elle est capable de se lier aux immunoglobulines, inhibant l'opsonisation des bactéries par les polynucléaires neutrophiles. *Staphylococcus epidermidis* ne contient pas de protéine A (**Karam, 2005**).

✓ **Protéine de liaison au collagène (Cna) :**

Les protéines du collagène étant des constituants majeurs de la matrice extracellulaire, elles représentent un site de choix pour l'ancrage de *S.aureus* aux tissus. L'attachement au collagène est d'ailleurs nécessaire et suffisant pour l'adhérence de *S.aureus* au cartilage in vitro (**Gras, 2006**).

✓ **Protéines de liaison à la fibronectine (FnBPA et FnBPB) :**

Les récepteurs pour la fibronectine contribuent à l'adhérence de *S.aureus* aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers (**Eveillard, 2007**). (Il existe

deux : les protéines de liaison à la fibronectine A et les protéines de liaison à la fibronectine B (Al Alam, 2008).

✓ **Protéine de liaison au fibrinogène (Clf) :**

C'est une protéine de surface qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Elle constitue un facteur de virulence pour les plaies et les infections sur corps étrangers (Eveillard, 2007).

✓ **Protéine de liaison à l'élastine (EbpS) :**

Contrairement aux autres protéines de surface, EbpS n'est pas ancrée au peptidoglycane. C'est une protéine transmembranaire qui se lie à la région NH<sub>2</sub> terminal libre de l'élastine (Eveillard, 2007).

## Chapitre II : les biofilms

### 1. Généralités :

Toute surface au contact d'un fluide peut être contaminée plus ou moins hâtivement par des substances organiques, inorganiques ou par des particules biologiques incluant des microorganismes, créant ainsi de véritables écosystèmes appelés « biofilms ». La première observation est sans doute à attribuer à Antoine Van Leeuwenhoek (1684), drapier à Delf, qui avait observé, avec une lentille grossissante, ancêtre du microscope, des organismes vivants cloués sur les dents. En 1923, Angst notait que les bactéries accrochées à la coque des bateaux étaient bien plus nombreuses que celles dans l'eau tout autour et il leur attribuait un rôle dans la corrosion des coques de bateaux (Mounier *et al.*, 2009).

Il est estimé que près de 80 % de la biomasse microbienne de la planète résiderait sous forme de biofilm. Ce mode de vie permet aux bactéries de survivre dans un environnement hostile et cela grâce entre autres à une plus grande résistance ou tolérance aux antibiotiques, aux désinfectants mais aussi à la réponse immunitaire de l'hôte, que les bactéries sous forme libre ou planctonique. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms peuvent amener des problèmes cliniques aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Les « National Institutes of Health » (NIH) aux États-Unis estiment que plus de 75% des infections microbiennes chez l'homme (ex : endocardite, septicémies, infections associées aux soins) sont imputables à la persistance des bactéries sous forme de biofilm (Goetz *et al.*, 2016).

### 2. Histoire de la formation de biofilm par les Staphylocoques :

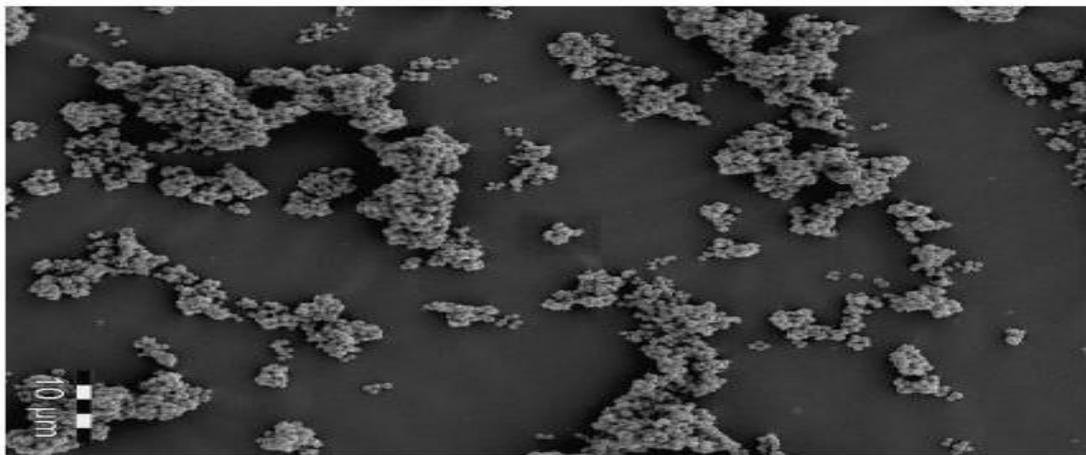
(Christensen *et al.* 1982) ont été les premiers à observer la formation d'un biofilm chez une souche de *S.epidermidis* isolée d'un cathéter. Ils ont noté la formation d'un film gluant, filamenteux sur des tubes de culture, puis ils ont visualisé cette substance extracellulaire par une coloration au bleu alcian en microscopie électronique à balayage. Ces auteurs ont écrit que la plupart des souches avaient une production variable de cette substance, qui dépendait du milieu et de la supplémentation en glucose. Ils ont suggéré que la formation de biofilm était un facteur critique dans la pathogénèse de *S.epidermidis*. Ces faits ont été confirmés la même année par (Peters *et al.*,1982) qui ont montré une corrélation entre la capacité de colonisation du matériel médical par *S.epidermidis* et les infections nosocomiales.

(Christensen *et al.*, 1985). Ont développé des procédés d'obtention de biofilm en tube plastique et en plaque de microtitration qui sont devenus aujourd'hui des méthodes de

référence pour sélectionner des souches formant des biofilms. Les cellules adhérentes sont colorées avec de la safranine, du violet cristal ou du bleu alcian, ce qui permet de compter les biofilms formés en raison de la proportionnalité entre le nombre de cellules et la quantité de colorant qu'elles fixent. Cette méthode de dosage a permis de montrer que les souches de *S.epidermidis* responsables d'infections formaient plus de biofilms que les souches de *S.epidermidis* saprophytes

### 3. Définition et caractéristiques commune de biofilm :

Un biofilm est défini comme une « communauté structurée de cellules bactériennes incluses dans une matrice polymérique auto-produite et adhérentes à une surface abiotique (ex : cathéters) ou biotique (ex : muqueuses) », tandis que Carpentier et Cerf ont simplifié le concept en tant que « communauté de microbes englobés dans une matrice organique polymérique et adhérents à une surface »(Kodjikian *et al.*, 2005).



**Figures 04 :** Visualisation au microscope électronique à balayage de biofilms de *Staphylococcus epidermidis* sur un implant intraoculaire(Baillif *et al.*, 2010).

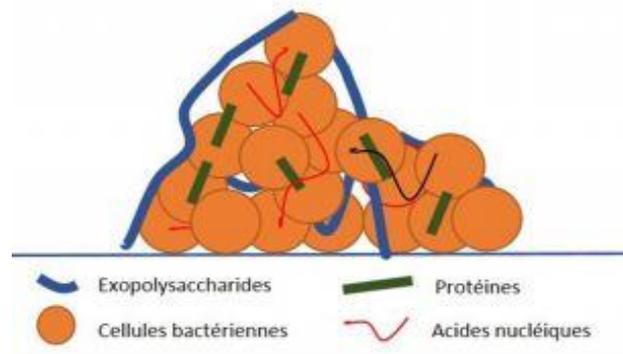
Dans chacune de ces définitions, nous retrouvons les trois éléments de base nécessaires à la composition d'un biofilm : les micro-organismes, le glycocalyx, et la surface d'adhésion, sans oublier bien sûr le milieu environnemental. Si un de ces composants manque, le biofilm ne peut pas se développer. Le glycocalyx est la« colle » qui maintient rapidement les bactéries entre elles et le biofilm à la surface colonisée ; c'est un complexe d'exopolysaccharides d'origine bactérienne qui emprisonne les substances exogènes présentes

dans l'environnement local, y compris les acides nucléiques, les protéines, les minéraux, les aliments, les constituants de la membrane cellulaire, etc. (Kodjikian *et al.*, 2005).

Les bactéries possédant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques conjointes. Premièrement, ces cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée (>90% d'eau) et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques et les constituants de la membrane cellulaire, etc. (Figure 5).

Cependant, leur répartition est fonction de l'espèce concernée. Par exemple, chez *S.aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellularadhesin »)(Goetz *et al.*, 2016).

Deuxièmement, le développement du biofilm répond à des signaux extracellulaires qui sont soit présents dans l'environnement proche de la bactérie soit produits par la bactérie elle-même comme par exemple le « quorum sensing » (QS). Troisièmement, le biofilm protège les bactéries de toute agression extérieure telle que le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation ou aussi les biocides (antibiotiques et désinfectants)(Goetz *et al.*, 2016).



**Figure 5** :Représentation schématique de la composition de biofilm(Goetz *et al.*, 2016).

#### **4. Formation de biofilm par les Staphylocoques :**

La formation d'un biofilm est un processus qui se déroule en deux phases. La première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface, et la seconde à la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche des cellules bactériennes. Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et

requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (Otto, 2008).

#### **4.1. Mécanisme de formation d'un biofilm Staphylococcique :**

##### **4.1.1. Adhésion :**

###### **a. Adhésion aux surfaces abiotiques :**

L'adhérence des microorganismes aux biomatériaux dépend de la nature de ces derniers et des caractéristiques de la surface cellulaire. Les interactions initiales surviennent par l'intermédiaire de forces physico-chimiques non spécifiques telles que les interactions électrostatiques, les forces de van der Waals, les interactions hydrophobes et les interactions acide-base (interactions de Lewis) (Speranza *et al.*, 2004; Garrett *et al.*, 2008)

.La colonisation des surfaces abiotiques par les Staphylocoques dépend de la charge de ses acides teichoïques (Gross *et al.*, 2001). L'attachement initial sur une surface abiotique est aussi attribué aux protéines de surface. C'est le cas de **Bap** (biofilm-associated protein) (Cucarella *et al.*, 2001) et de la protéine A (Henry-Stanley *et al.*, 2011).

###### **b. Attachement aux surfaces biotiques :**

Dans le corps humain, la formation du biofilm est initiée par l'attachement irréversible des adhésines des cellules bactériennes aux protéines de la matrice extracellulaire. Chez *S.aureus*, l'adhérence est médiée par les adhésines protéiques de surface de la famille de MSCRAMM qui ont la capacité de se fixer aux différentes protéines du plasma ou de la matrice extracellulaire telles que le fibrinogène ou la fibronectine (Foster and Höök, 1998). Après leur implantation, les biomatériaux (cathéters, prothèses orthopédiques, sondes urinaires, valves cardiaques...) sont aussitôt couverts par les protéines de la matrice extracellulaire ou du plasma. Les interactions spécifiques entre les protéines de l'hôte et les MSCRAMMs sont alors très importantes pour l'établissement d'une colonisation bactérienne (Otto, 2008).

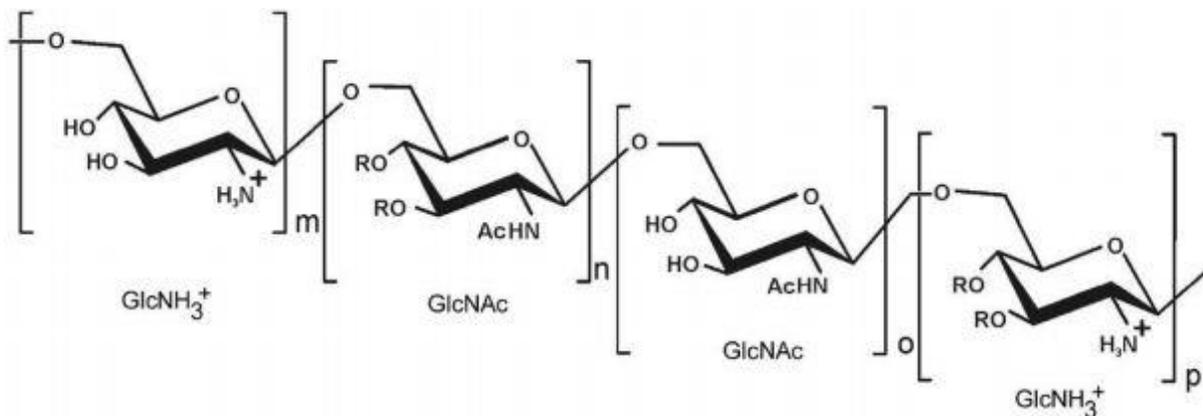
##### **4.1.2. Multiplication des bactéries et maturation du biofilm :**

Après l'attachement à la surface, les bactéries vont se multiplier et s'accumuler. Cette phase est caractérisée par l'agrégation intercellulaire pouvant s'accomplir par une variété de

molécules telles que les protéines d'adhésion ou le plus souvent par les exopolymères polysaccharidiques, et la structuration conduisant à l'obtention d'une communauté mature, multicouche sous forme de champignon, et contenant des canaux qui permettent le passage des nutriments pour les bactéries présentes à l'intérieur du biofilm (Otto, 2008).

**a. Adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) :**

Chez les Staphylocoques, la principale molécule responsable de l'adhésion intercellulaire est la PIA (polysaccharide intercellularadhesin), C'est un polymère de résidus de N-acétylglucosamine partiellement déacétylés et réunis par une liaison  $\beta$ -1-6. Ce polymère forme avec les autres polymères tels que les acides teichoïques et les protéines, le slime, la matrice extracellulaire des Staphylocoques formant le biofilm (Götz, 2002). Elle introduit une charge positive dans le polysaccharide en libérant des fonctions amines libres chargées au pH neutre ou acide, tel celui trouvé sur la peau de l'homme (Vuong *et al.*, 2004).



**Figure 06 :** Structure de l'adhésine polysaccharidique intrcellulaire (PIA)(Mack *et al.*, 1996).

**b. Biosynthèse du PIA :**

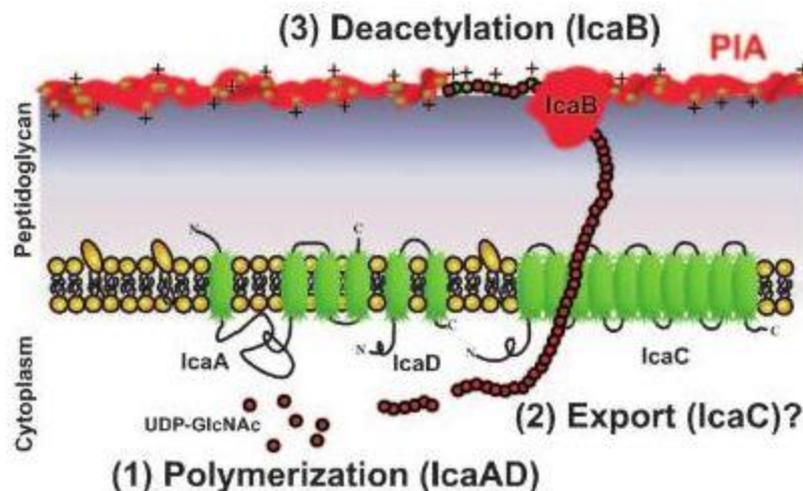
Identifié pour la première fois chez *Staphylococcus epidermidis*, l'opéron *ica* est aussi présent chez *S.aureus* et chez d'autres espèces de *Staphylococcus spp*(Cramton *et al.*, 1999; Heilmann *et al.*, 1996). La biosynthèse du PIA est effectuée par les produits de gènes codés par l'opéron *icaADBC* qui comprend une N-acétylglucosamine transférase (*icaA* et *icaD*), une PIA déacétylase (*icaB*) et un exportateur potentiel du PIA (*icaC*)(Vuong *et al.*, 2004) (Figure 07).

Elle s'effectue en trois étapes:

1. *icaA* ajoutent à la chaîne de PIA en croissance, les résidus N-acétylglucosamine provenant d'UDP-Glc-Nac. La transférase *icaA* nécessite la présence d'*icaD* pour une pleine activité. L'activité N-acétylglucosamine transférase conduit à l'obtention d'oligomères de N-acétylglucosamine d'environ 20 résidus.

2. La chaîne de PIA en croissance est ensuite exportée à travers la membrane par *icaC* qui est aussi nécessaire à l'allongement de la chaîne

3. Après son exportation, la PIA est déacétylée par une protéine attachée à la surface, *icaB*, afin d'introduire des charges positives, cruciales pour son emplacement en surface et pour son activité biologique (Vuong *et al.*, 2004).

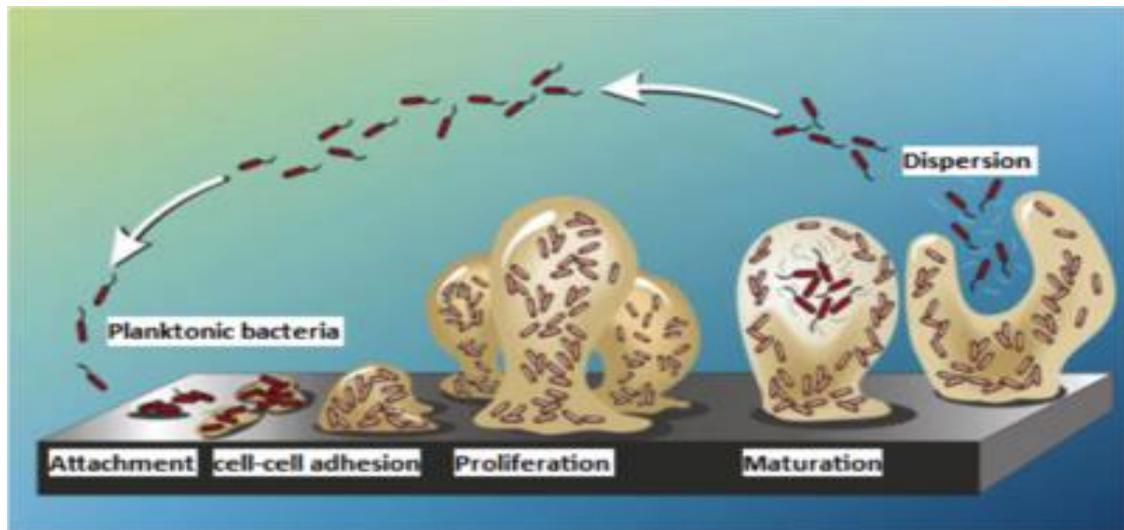


Figures 07 : Biosynthèse de PIA chez *Staphylococcus* spp (Liesse Iyamba, 2012).

#### 4.1.3. Détachement du biofilm :

La dispersion du biofilm joue un rôle très important dans les infections associées aux biofilms. C'est le cas des infections métastatiques telles que les ostéomyélites et les abcès, les complications d'embolies d'une endocardite provoquées par le détachement d'un biofilm des valves (Von Eiff *et al.*, 2005; Boles and Horswill, 2011b). Le principal mécanisme de détachement du biofilm utilisé par *Staphylococcus* est la production d'enzymes extracellulaires ou des surfactants qui dégradent et solubilisent les différents composants de la matrice du biofilm. Ainsi, les principaux facteurs de détachement sont les protéases, les DNases et les surfactants PSM (Phenol-soluble modulins). A ceux-ci, il faut ajouter le système de quorum sensing qui contrôle la production de ces enzymes et des PSM

dégradant la matrice du biofilm, et certaines conditions environnementales, telles que la carence en glucose dans le milieu de culture (Boles and Horswill, 2011a; McDougald *et al.*, 2012). (Figure 08)



**Figure 08 :** Mécanisme de la formation de biofilm(Clutterbuck *et al.*, 2007).

#### **4.2. Matrice de biofilm :**

Substance d'exopolymère (EPS) est une matière gélatineuse recouvrant les cellules d'un biofilm. Les propriétés physico-chimiques de l'EPS sont variables d'un biofilm à un autre, mais un biofilm est initialement constitué de polysaccharides. La composition et la structure de polysaccharides déterminent la conformation primaire du biofilm. La quantité des EPS produits varie en fonction du micro-organisme, et elle augmente avec l'âge du biofilm. La matrice du biofilm peut aussi être composée d'ions métalliques, de cations divalents, de macromolécules (protéines, ADN, lipides, phospholipides) et de composants de l'hôte (Sutherland, 2001; Donlan, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

La matrice d'exopolysaccharides exerce différents rôles. Elle assure la protection et la cohésion de chaque microcolonie bactérienne, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes. L'EPS intervient aussi sur la relation des microorganismes entre eux et avec les surfaces. Son important degré d'hydratation, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel. Cette matrice contribue aussi aux propriétés d'antibiorésistance des biofilms en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm(Wingender *et al.*, 1999).

### 4.3. Régulation moléculaire en biofilm chez les Staphylocoques :

Les systèmes régulateurs chez les Staphylocoques sont gouvernés principalement par deux loci: l'opéron « accessorygeneregulator » (*agr*) et l'opéron « Staphylococcalaccessoryregulator » (*sar*) (Pratten *et al.*, 2001). Ces systèmes sont dit « accessoires » car ils ne sont pas essentiels à la croissance mais ils sont activés à certaines phases de la croissance cellulaire ou lors de certaines conditions environnementales. Des régulateurs additionnels permettent aux microorganismes de répondre aux signaux environnementaux, ce sont des systèmes à deux composantes qui sont au nombre de 17 chez *S.aureus* (Toledo-Arana *et al.*, 2005). Parmi eux, le système arlRS, pour « autolysisrelated locus », semble jouer un rôle dans la formation de biofilm (Liang *et al.*, 2005; Toledo-Arana *et al.*, 2005).

#### 4.3.1. Système Accessory Gene Regulator (*agr*):

L'opéron *agr* est un régulateur global exprimé en fin de phase de croissance qui contrôle l'expression de plus de 100 facteurs de virulence. En plus de coder pour un système à deux composants, l'opéron *agr* a la particularité d'exprimer un système de recensement de la population. Les deux systèmes fonctionnent de manière coordonnée et permettent à l'opéron *agr* de sonder à tout moment la densité cellulaire par un mécanisme appelé « quorum sensing ». Ce mécanisme établit une communication entre les cellules et chez les *S.aureus* déterminé le passage entre la phase de colonisation et la phase de dissémination (Chevalier, 2009).

Chez *S.aureus* et *S.epidermidis*, dans la phase initiale de la colonisation où la densité cellulaire est faible, le système *agr* est quasi inactif et les protéines de surfaces principalement des adhésines sont exprimées permettant la colonisation. Quand la densité cellulaire augmente, le système *agr* devient actif et réprime l'expression des protéines de surface. Il active la production des enzymes de dégradation extracellulaire dont certaines sont nécessaires pour l'acquisition nutritionnelle *in vivo*. Il active aussi la synthèse d'exotoxines permettant aux Staphylocoques de s'échapper du site d'infection et de s'étendre à de nouveaux sites (Planchon, 2006). Le système *agr* intervient également dans le processus de dispersion des biofilms (Oubekka, 2012).

#### **4.3.2. Systèmesar (Staphylococcal Accessory gene Regulator) :**

Le système régulateur sar comporte au minimum trois promoteurs différents (P1, P2 et P3) conduisant à la synthèse de trois transcrits désignés respectivement sarA, sarB et sarC. Les transcrits sarA et sarB sont principalement exprimés en phase exponentielle de croissance et le transcrit sarC est principalement exprimé en phase post-exponentielle de croissance (**Bayer *et al.*, 1996**). Les mutants sar- présentent un déficit marqué de leur fixation à la fibronectine alors que le système agr n'a pas d'influence sur cette dernière(**Gras, 2006**).

Chez *S.aureus*, sarA apparait comme un régulateur essentiel contrôlant la formation de biofilm et ainsi pourrait être une cible pour contrôler le processus infectieux. Toutefois, des différences « souches dépendantes » ont pu être observées dans les rôles régulateurs de sarA et agr chez *S.aureus*(**Trottonda *et al.*, 2005**).

#### **4.4. Facteur favorisant la formation de biofilm :**

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (**Donlan, 2002**).

##### **4.4.1. Caractéristiques de la surface :**

###### **a. Type de surface :**

La surface d'adhésion des organismes sessiles peut être abiotique (les matériaux inertes) ou biotique (les tissus ou cellules vivantes). Pratiquement n'importe quelle surface (animale, minérale, ou végétale) est capable d'être le siège d'une colonisation bactérienne avec formation d'un biofilm, y compris les coques des bateaux, les canalisations d'eau, de pétrole, les rochers dans les rivières, les lentilles de contact, et toutes les variétés d'implants biomédicaux(**Kodjikian *et al.*, 2005**).

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques sur une surface jouent une influence sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm(**Kodjikian *et al.*, 2005**).

### **b. Rugosité de la surface :**

Plus la surface du biomatériau est rugueuse plus l'adhésion bactérienne est favorisée. Une surface identique plus lisse sera moins propice à la fixation bactérienne (**Baillif et al., 2010**).

Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan and Costerton, 2002**). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques (**Donlan and Costerton, 2002**).

### **c. Propriétés physico-chimiques de la surface :**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Donlan and Costerton, 2002**).

### **d. Présence de films protéiques sur la surface :**

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (**Mittelman, 1996**).

L'attachement à une matrice protéique est la première étape de formation d'un biofilm dans le corps humain (**Otto, 2008**). Par exemple, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* expriment à leur surface des molécules, les MSCRAMM, capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine. Ces interactions spécifiques entre matrice protéique de l'hôte et MSCRAMM sont très importantes pour l'établissement de la colonisation bactérienne (**Patti et al., 1994**).

#### **4.4.2. Caractéristiques du milieu :**

Les facteurs environnementaux tels que la température, Le pH, la concentration en certain cation tell que le NaCl, l'existence de flux, la qualité et la quantité des substances nutritives environnantes affectent l'adhésion bactérienne et la formation d'un éventuel biofilm. En effet, ils ont une forte influence sur l'expression du génome bactérien (**Baillif et al., 2010**).

##### **a. Température :**

L'augmentation de la température favorise la multiplication bactérienne. Elle semble stimuler l'adhésion des micro-organismes et modifier la sécrétion de slime. En effet, l'expression phénotypique de certaines souches bactériennes, dont *Staphylococcus epidermidis*, fluctue avec les variations de température. Généralement quand celle-ci croît et se rapproche de 35°C, l'expression de certaines adhésines intervenant dans la phase d'adhésion irréversible ainsi que la production de slime augmentent(**Baillif et al., 2010**).

##### **b. pH :**

Conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité (**Martinez and Casadevall, 2007**).

Le pH de milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposé selon leur pKa(**Boutaleb, 2007**).

##### **c. Sources de carbone disponibles :**

Elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez and Casadevall, 2007**).

##### **d. Concentrations en nutriments :**

Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm, ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**López et al., 2010**).

#### **e. Concentrations en certain cation :**

Des concentrations importantes en NaCl augmentent la formation de biofilm et induisent l'expression d'ica chez les Staphylocoques. La présence de cations divalents tels que le calcium et le magnésium, sodium, accroît la production de polysaccharides conduisant à une amplification de la formation de biofilms (**Knobloch *et al.*, 2001**).

#### **f. Forces hydrodynamiques :**

Les forces hydrodynamiques sont considérées comme étant les facteurs environnementaux les plus susceptibles d'affecter l'adhésion bactérienne et le développement du biofilm bactérien(**Baillif *et al.*, 2010**).

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

#### **4.4.3. Propriétés des cellules :**

Pour une surface attribuée, l'adhésion bactérienne sera en fonction de l'espèce bactérienne et même de la souche bactérienne utilisée du fait de caractéristiques physicochimiques différentes(**Baillif *et al.*, 2010**).

#### **a. Charge de la surface bactérienne :**

La majorité des particules acquièrent une charge électrique de surface lorsqu'elles sont plongées en suspension dans un milieu aqueux. Cette charge résulte de l'ionisation de leurs groupes de surface. Elle est déterminée par la mesure de la potentielle électrocinétique ou de la mobilité électrophorétique.

Les bactéries en solution aqueuse sont en général presque toujours chargées négativement Une bactérie dont la charge de surface est haute est presque toujours hydrophile. Cette charge changé en fonction de l'espèce bactérienne et est influencée par le milieu de culture (pH, force ionique), par l'âge de la bactérie ainsi que la structure de sa surface(**Baillif *et al.*, 2010**).

## **b. Caractère hydrophile/hydrophobe de la surface bactérienne :**

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface.

L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. La majorité des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides... Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan and Costerton, 2002).

### **4.5. Prévention et élimination de biofilm :**

#### **4.5.1. Inhibition de l'adhésion microbienne :**

Deux stratégies de traitement de surface sont généralement utilisées: la première consiste à utiliser les solutions verrous pour lutter contre l'adhésion, la seconde, à éliminer ces pathogènes par incorporation sur la surface, de molécules antimicrobiennes (Von Eiff *et al.*, 2005).

##### **a. Solutions verrous :**

La solution verrou traditionnelle contient de l'héparine, à raison de 5.000 à 10.000 UI/mL. Mais des faibles concentrations d'héparine stimulent *in vitro* la formation du biofilm (Shanks *et al.*, 2005). Le citrate trisodique est utilisé comme solution verrou en raison de ses propriétés antimicrobiennes puissantes, sans risque de résistance. Les concentrations supérieures à 0,5- 4% préviennent *in vitro* la formation du biofilm par *S.aureus*, mais ne détruisent pas un biofilm préexistant (Shanks *et al.*, 2006). Les propriétés antibactériennes du citrate peuvent être accrues par l'adjonction d'autres substances, comme la gentamycine, la lepirudine, l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) (Shanks *et al.*, 2006) ou la taurolidine (Shah *et al.*, 2002).

## **b. Traitements par incorporation d'agents antimicrobiens :**

Pour empêcher l'adhésion des microorganismes sur les surfaces des implants médicaux, les efforts de recherche se sont focalisés sur le traitement des surfaces par diverses molécules. Parmi les systèmes les plus répandus, on peut citer: l'addition des métaux ou des enzymes sur les surfaces et l'imprégnation aux antibiotiques et/ ou aux antiseptiques (**CCR de Carvalho, 2012**). Cependant, l'utilisation des antibiotiques ou des antiseptiques à des concentrations sub-inhibitrices ou à titre prophylactique pour prévenir les infections des implants médicaux, contribue à l'augmentation de la formation des biofilms et à la sélection des mutants résistants (**Campoccia et al., 2010**).

### **4.5.2. Traitement du biofilm Staphylococcique préformé :**

La thérapie possible des infections associées au biofilm pourrait être basée sur la combinaison des molécules anti-biofilm avec différents antibiotiques conventionnels (**Otto, 2008**). Ont démontré que le linézolide et la vancomycine administrés séparément, étaient moins efficaces sur le biofilm de *S.aureus* que la daptomycine, la minocycline et la tigécycline. Cependant, la destruction du biofilm et la mort des bactéries planctoniques étaient obtenues avec l'association rifampicine-linézolide ou vancomycine. Une autre étude a montré que l'amikacine et la ciprofloxacine pénétraient les biofilms de *S.aureus* et *S.epidermidis* (**Raad et al., 2007**).

Contrairement à l'oxacilline, la cefotaxime et la vancomycine dont la pénétration était significativement réduite (**Singh et al., 2010**).

L'utilisation des substances telles que les phages (**Kelly et al., 2012**) les enzymes (la lysostaphine, la DNase I, la protéinase K, la protéase V8) (**Kiedrowski and Horswill, 2011**) Capables de détruire l'intégrité physique de la matrice du biofilm, constitue aussi une approche antibiofilm attractive.

D'autres stratégies ont été étudiées dans le but de promouvoir la libération des cellules bactériennes du biofilm de *S.aureus*, et augmenter ainsi leur sensibilité à la vancomycine. Il s'agit notamment du traitement photodynamique (FTD) (**Di Poto et al., 2009**) et de la vaccination contre des biofilms (**Brady et al., 2011**).

## Partie II : Matériel et méthodes

### 1. Méthodologie et contexte de l'étude

Les Staphylocoques sont impliqués dans diverses pathologies humaines et animales et constituent aussi un risque majeur dans les toxi-infections alimentaires. Ils possèdent un pouvoir de pathogénicité très varié, primordialement virulent, toxigénique et hémolytiques ; comme ils acquièrent de multiples résistances aux antibiotiques et une capacité à former des biofilms sur différentes surfaces biotiques (ex : cellules de la muqueuse) ou abiotiques (ex : biomatériaux).

L'aptitude des Staphylocoques à former des biofilms constitue un souci majeur en industries agro-alimentaires à cause de l'inefficacité des procédures de nettoyage et désinfection et la difficulté d'éradiquer ces bactéries aux surfaces alimentaires ; aussi constitue un problème en médecine humaine et animale, parce que les matrices de biofilms constituent une barrière contre l'effet des antibiotiques et diminuent l'efficacité thérapeutique des antibiotiques. Plusieurs études ont établi, les liens entre la pathogénicité des souches de Staphylocoques et la résistance aux antibiotiques d'une part, le portage des gènes d'adhésion aux surfaces et le potentiel de formation de biofilm d'une autre part.

Dans ce contexte, il nous a semblé très intéressant d'étudier le potentiel de formation du biofilm des souches de Staphylocoques d'origine humaine et animales isolés sur la région de Médéa et Ain Defla, Algérie (**Achek *et al.*, 2018**). Ces souches 'support' ont été analysés pour leurs portages aux gènes de résistance et d'adhésion à l'essor du travail du Dr Achek Rachid (Résultats non publiés).

Dans ce travail, nous essayeront d'estimer le potentiel de formation de biofilm par deux méthodes référencées, en occurrence la méthode Rouge Congo Agar (RCA), et la méthode de plaque de culture de tissu (TCP).

Notre étude comprend aussi une exploration de l'effet de quelques facteurs NaCl sur la formation du biofilm et tester le potentiel de formation sur les surfaces abiotique (acier inoxydable) chez les souches de Staphylocoques.

## 2. Matériels et Méthodes :

Ce travail a été réalisé au niveau d'unité de bactériologie du laboratoire d'analyse médicale Dr ZIBOUCHE Abdellah de AIN- DEFLA durant la période allant de 23 février jusqu'au 13 juin 2019, au niveau des laboratoires pédagogique de l'université de MEDEA et DJILALI BOUNAAMA khemis miliana.

### 2.1. Matériel biologique :

#### 2.1.1. Origine des souches :

Dans ce travail, les souches étudiées ont été isolées à partir des différents échantillons. Les souches d'origine animale ont été isolées à partir du lait de mammite chez des brebis présentant une infection des glandes mammaires (souches dites **S**). Les souches d'origine alimentaires ont été isolées à partir des matrices alimentaires suivantes : lait cru, viande et dérivés, plats cuisiniers, produits de pâtisserie (souches dites **F**). Les souches d'origine clinique ont été isolées à partir de différents échantillons pathologiques comme: le pus, le sperme, l'urine, les pertes vaginales, les prélèvements de gorge, les prélèvements urétraux, les liquides articulaires, les cathéters et les dispositifs médicaux (souches dites **M**). D'autres souches ont été isolées à partir des écouvillons nasaux prélevés à partir des personnes travaillant dans fermes animales ou ayant un contact étroit avec les animaux comme les ouvriers et vétérinaires (souches dites **N**). Tous les échantillons ont été prélevés dans la région de Médéa et Ain Defla (Tableau 02).

**Tableau 2 :** Nombre et les origines des souches de Staphylocoque.

Origined'échantillons	Mammite ovine	Echantillons alimentaires	Echantillons médicaux	Ecouvillons nasaux
Nombre des souches	34	9	4	15

#### 2.1.2. Isolement et identification des souches :

Pour les échantillons alimentaires, l'isolement des souches a été effectué selon la norme ISO 6888-1:1999/A1:2003 relative au dénombrement des Staphylocoques (*S.aureus* et autre espèces) ; Partie 1: Technique utilisant le milieu gélose de Baird Parker.

Les autres souches ont été isolées selon des protocoles de la microbiologie classique illustrés dans la littérature par (Denis *et al.*, 2011), l'utilisation de milieux adaptés aux bactéries à Gram positif telle qu'une gélose au sang cuit (gélose chocolat) ou gélose au sang frais, un milieu sélectif pour les coques à Gram positif tel que le milieu hyper salé au mannitol (Chapman).

Après purification, les souches dites N et S ont été conservé à -20°C dans un bouillon BHIB additionné de 30% de glycérol. Les souches dites F et M ont été conservé par lyophilisation au lait écrémé stérilisé. Les souches ont été identifiés et caractériser par la technique MALDI-TOF. La détection de gènes responsables de formation biofilms (*icaAicaC*, *icaD*, *bap*) à été réalisé d'une technique de biologie moléculaire des puces à ADN (DNA Microarray) (le détail de la technique MALDI TO MS de l'identification des souches et l'étude du support génétique par puce à ADN sont présentés dans l'annexe II).

### **2.1.3. Revivification et vérification de la pureté des souches :**

Nous étions à la disposition d'utiliser à usage expérimental 62 souches de Staphylocoques ; 49 souches conservées dans le BHIB additionné de glycérol et 13 souches lyophilisées.

La revivification des 49 souches conservé au glycérol a été effectuée dans le milieu Baird Parker ; et incubées à 37°C pendant 48h à 72h.

Pour les 13 souches lyophilisées, la revivification a été effectuée tout d'abord dans le milieu BHIB et incubées à 37°C pendant 72h. Après incubation, les souches ont étéensemencées dans le milieu Baird Parker et incubées à 37°C pendant 72h.

La vérification de la pureté des souches a été réalisé sur gélose Chapman qui est un milieu sélectif pour les Staphylocoques, sa teneur élevée en chlorure de sodium limite le développement de certains germes autres que *Staphylococcus*. Les micro-organismes fermentant le mannitol donnent des colonies jaunes. Ce caractère est un critère d'orientation pour l'identification de *Staphylococcus aureus* (Leyral and Vierling, 2007).

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur gélose Chapman avec incubation à 37°C pendant 24 à 48h, jusqu'à l'obtention des colonies de même taille, même forme et même couleur renseignent sur la pureté des souches.

## **2.2. Matériel non biologique :**

On a utilisé différentes catégories de matériel de laboratoire (équipements, petit matériel et instrument), des milieux de culture et réactifs. L'annexe I regroupe la liste du matériel, ainsi que les formules et le mode de préparation des milieux de culture utilisés.

## **3. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro* :**

### **3.1 Méthode du Rouge Congo Agar :**

La détection phénotypique de la production de slime chez les souches de Staphylocoque a été étudié par culture sur gélose Rouge Congo comme décrite précédemment par (**Freeman *et al.*, 1989; Snoussi *et al.*, 2008; Zmantar *et al.*, 2008**).

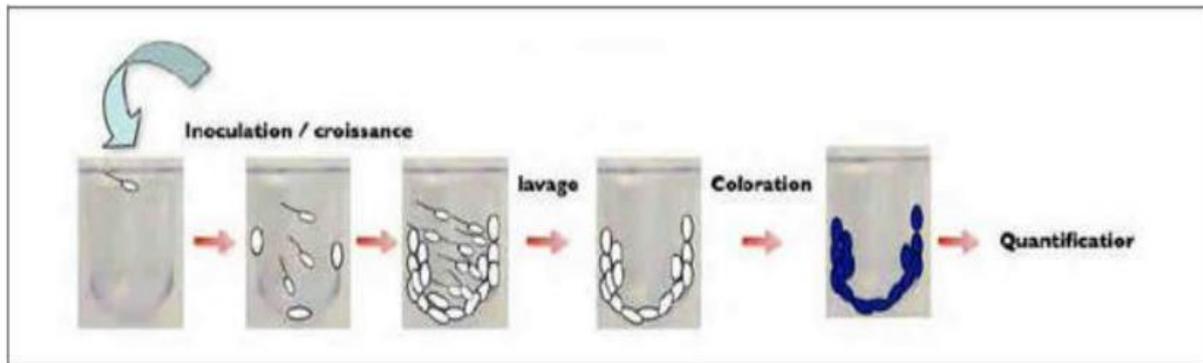
L'ensemencement est fait en stries simple ou croisé à la surface de la gélose à partir d'une culture jeune, les boîtes ensemencées sont incubé à 37 °C pendant 24h puis laissez sur paillasse 24 à 72h car Il est trouvé au préalable que la production de slime par les *S.aureus* sur gélose Rouge Congo est moins rapide (48-72h)(**Arciola *et al.*, 2001a; Arciola *et al.*, 2001b**).

L'évaluation de la production de slime est déterminé par la couleur de colonie observé, les colonies présentant une couleur noire et bordeaux presque noire sont classé comme des souche productrice de biofilm, les colonie de phénotype rouge et bordeaux comme non productrice de biofilm(**Satorres and Alcaráz, 2007**), Les souches de phénotype variable donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge, ou à centre rouge et à contour noire (**Touati *et al.*, 2007**).

Le rouge Congo interagit directement avec certain polysaccharides, ceci formant un complexes ou probablement changeant le colorant en métabolite secondaire qui joue un rôle important dans la formation de colonie noire(**Arciola *et al.*, 2001a; Jain and Agarwal, 2009**).

### **3.2 Méthode de culture sur microplaque (TCP) :**

Le pouvoir de production de biofilm *in vitro* par les isolats de Staphylocoque a été déterminé suivant la méthode (**Cucarella *et al.*, 2001**), avec des modifications minimales, cette méthode permet une détermination quantitatif du biofilm formé en mesurant la densité optique relié au colorant présent dans le biofilm (**Musk *et al.*, 2005**).



**Figure 09 :** Principe de la méthode TCP.

Les souches de Staphylocoque ont été cultivé individuellement pendant 18h à 24h dans le TSB à 37°C (Knobloch *et al.*, 2001; Mack *et al.*, 2001), après cette durée d'incubation la culture obtenue a été dilué en 1 :100 dans le TSB additionné de glucose à 1% (TSB+G) pour maximisé l'induction d'opéron *ica* (Rachid *et al.*, 2000). Un volume de 200 µl de la suspension bactérienne est déposé dans les puits de microplaques en polystyrène stériles de 96 puits en forme "U", chaque culture bactérienne a été utilisé en 3 fois pour assure une exactitude des résultats. Parallèlement, un même volume de 200 µl du TSB additionné à 1% de glucose et non ensemencé est déposé dans trois puits et servant comme contrôle négatif, la microplaque est incubé à 37°C pendant 24h sans agitation.

Après la durée d'incubation, Les puits ensemencé de la microplaque sont ensuite vidés et la suspension bactérienne est éliminée. Suivie de 3 rinçages par le Phosphate Buffered Saline (PBS pH=7.4) afin d'éliminé les bactéries non adhérent, puis la microplaque est séché à une température ambiante en position inversé pendant 30min.

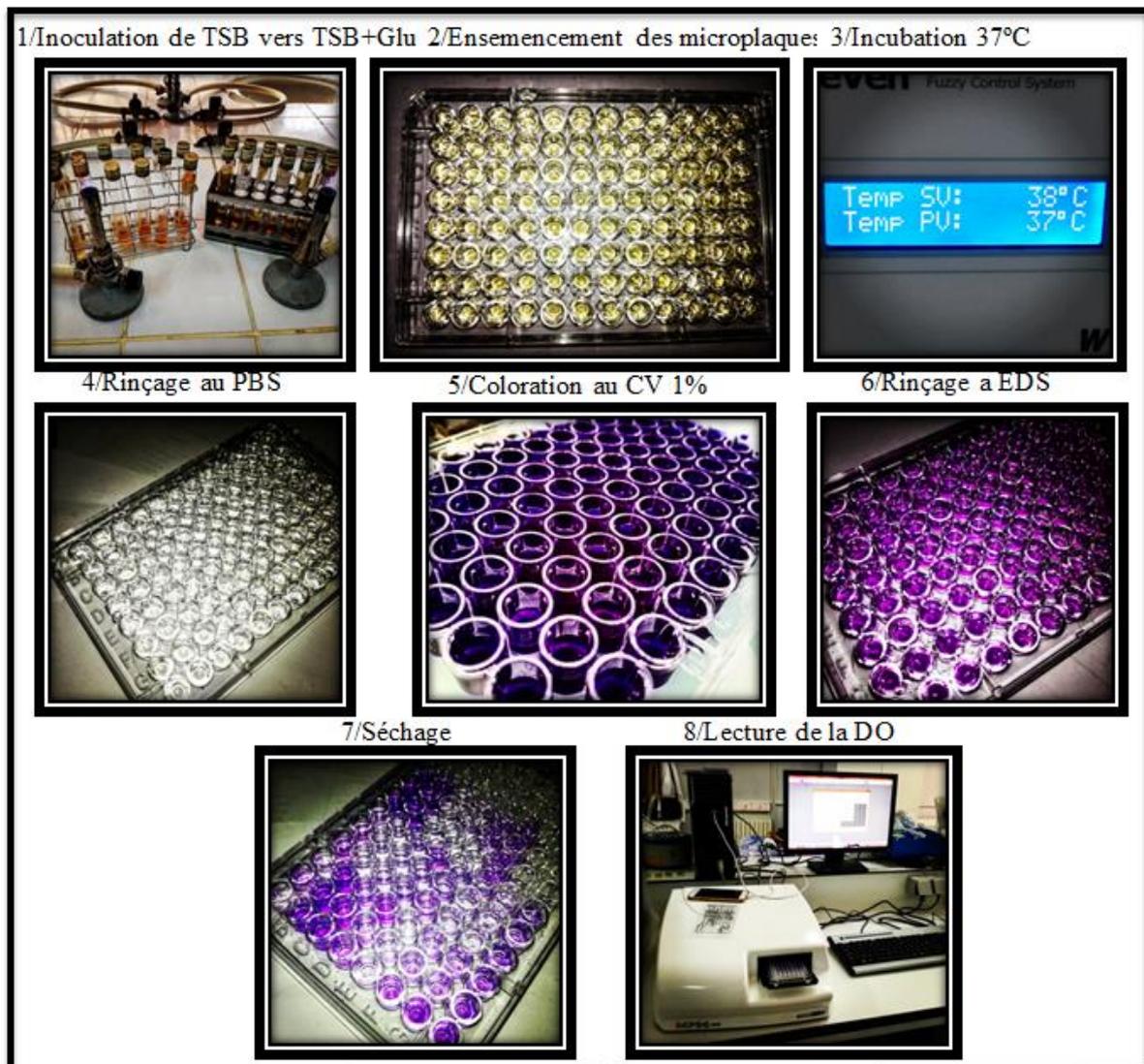
Les puits de la microplaque séchés sont ensuite coloré par 200µl de Crystal violet à 1% dans chaque puit, après 15min le colorant Crystal violet est éliminé et les puits sont rincé 3 fois à l'eau distillé stérile pour éliminer toute trace de colorant non fixé, les plaques sont ensuite séché à une température ambiante en position inversé. Enfin les puits sont rempli encore une fois avec 200µl d'éthanol à 95% pour le processus de solubilisation du Crystal violet contenu dans le biofilm formé dans les puits.

La densité optique est mesuré à 600nm par le lecteur de microplaque (ELISA) (model SafasmonacoMP96) couplé à un ordinateur.

Selon les travaux de (Christensen *et al.*, 1985), les souches compte tenu de leur pouvoir adhérent, ont été classées en quatre catégories : non adhérentes, faiblement adhérentes, modérément adhérente et hautement adhérente(Stepanović *et al.*, 2000; Stepanović *et al.*, 2007):

**Tableau 3** : Classification de la formation de biofilm selon (Stepanović *et al.*, 2007).

Moyennes des valeurs de DO	Formation de Biofilm	Interprétation
DO lue $\leq$ DOnc	-	Absence
DOnc < DO lue $\leq$ 2XDOnc	$\pm$	Faible
2XDOnc < DO lue $\leq$ 4XDOnc	+	Modéré
DO lue > 4XDOnc	++	Forte



**Figure 10:** Etapes de la méthode TCP(photo personnelle)..

#### 4. Etude de l'effet de quelques facteurs sur la formation du biofilm :

Dans cette partie, on essaye d'évaluer l'effet de quelque paramètre sur la capacité de formation du biofilm de 14 souches de Staphylocoques. Le facteur utilisé est l'NaCl avec différentes concentrations.

##### 4.1 Choix des souches :

A partir du nombre total des souches de Staphylocoques testés auparavant par la méthode TCP, un nombre de 14 souches ont été choisies pour étudier l'effet du NaCl sur la formation de biofilm. Le choix des souches a été effectué d'une façon à obtenir des souches de chaque origine avec un potentiel de formation de biofilm variable.

**Tableau 4** : les souches de *Staphylococcus* spp choisies selon leur potentiel de formation du biofilm.

Souche	Moyenne de la DO	Formation du biofilm
S5	0.620	++
S11	0.132	±
S19	0.128	±
S27	0.142	±
S40	0.338	+
N8	0.341	++
N16	0.341	++
N17	0.127	±
N18	0.107	-
F3	0.462	++
F8	0.580	++
F29	0.132	±
M4	0.480	++
M30	0.456	++

- : non formatrice de biofilm, +/- : faiblement formatrice de biofilm, + : modérément formatrice de biofilm, ++ : fortement formatrice de biofilm.

#### 4.2 Evaluation de l'effet de NaCl sur le pouvoir de formation du biofilm :

Afin de déterminer l'effet des différentes concentrations de NaCl sur la capacité de formation de biofilm, la technique a été effectuée suivant les travaux de (Lee *et al.*, 2014) avec des modifications minimales.

Les souches de Staphylocoque ont été cultivées séparément dans 5ml de Bouillon Tryptone Soja (TSB) à 37°C pendant 24h, une suspension bactérienne de 20 µL est ajoutée à 230µL de milieu TSB additionné de 2% et de 6% de NaCl dans des microplaques stériles à 96 puits en polystyrène en forme "U," les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24h. Les puits sont vidés et rincés trois fois à l'eau distillée stérile, puis 250 µl d'éthanol est ajouté pendant 15min pour fixer les cellules bactériennes, l'éthanol est ensuite éliminé et les puits sont colorés par 250 µl de Crystal Violet à 0,5% dans chaque puit pendant 5min. Le Crystal violet est éliminé et les puits sont rincés trois fois à l'eau distillée stérile.

Enfin, 250 µL d'acide acétique est ajouté dans chaque puit et laissé pendant 5min, la densité optique (DO) est mesurée à 600nm par le lecteur ELISA (modèle MP96).

#### 4.3 Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne de *Staphylococcus* spp par la technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) :

L'hydrophobicité de la paroi est estimée selon le protocole MATH (Rosenberg, 1981, 2006) avec des modifications minimales et en utilisant l'héxadécane comme solvant. Les souches de *Staphylococcus* spp sont cultivées séparément dans 5mL de bouillon tryptone soja TSB et incubées pendant 18h à 37°C. Les cellules sont récupérées après centrifugation (5000 tours/min) pendant 15 minutes. Le culot obtenu est ensuite lavé après 2 centrifugations successives à l'aide du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline pH= 7.1) et mis en suspension dans le même tampon à une densité optique initiale (DO<sub>i</sub>) comprise entre 0,8 et 1 à 600nm. Un volume de 0,3mL de chaque solvant est ajouté à 1,8mL de suspension bactérienne puis l'ensemble est agité au vortex pendant 2min. Après 20min de décantation, la DO (DO<sub>f</sub>) de la phase aqueuse est mesurée à 600nm (figure 11). Le pourcentage d'adhésion au solvant est alors calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'adhésion au solvant (CSH \%)} = \frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \times 100$$

Lorsque la CSH(%) < 20% hydrophile

CSH(%) > 40% hydrophobe

20% < CSH(%) < 40% moyennement hydrophobe



**Figure 11:** Etapes de la méthode MATH (photo personnelle)

## **5. Evaluation de la capacité des souches à former le biofilm sur l'acier inoxydable :**

### **5.1 Nettoyage des lames d'acier inoxydable (inox) :**

Les lames sont pr par es suivant la technique de (Peng *et al.*, 2001).

Les lames coup es dans des dimensions de 5 cm sur 2 cm sont submerg es dans un mélange d'éthanol et d'acétone (v/v) pendant une heure, afin d'éliminer les traces des matières grasses, ensuite les lames sont rinc es à l'EDS puis submerg es dans une solution de NaOH à 2% pendant 5 minutes à 70 C, suivie d'un deuxième rinçage des lames à l'EDS, puis elles sont submerg es dans la solution de HNO<sub>3</sub>   1% pendant 5 minutes à 70 C, suivie d'un dernier rinçage à l'EDS. Enfin les lames sont recouvertes en papier aluminium et stériliser par l'autoclave à 120 C pendant 1h.

### **5.2 Essai d'obtention d'un biofilm expérimental :**

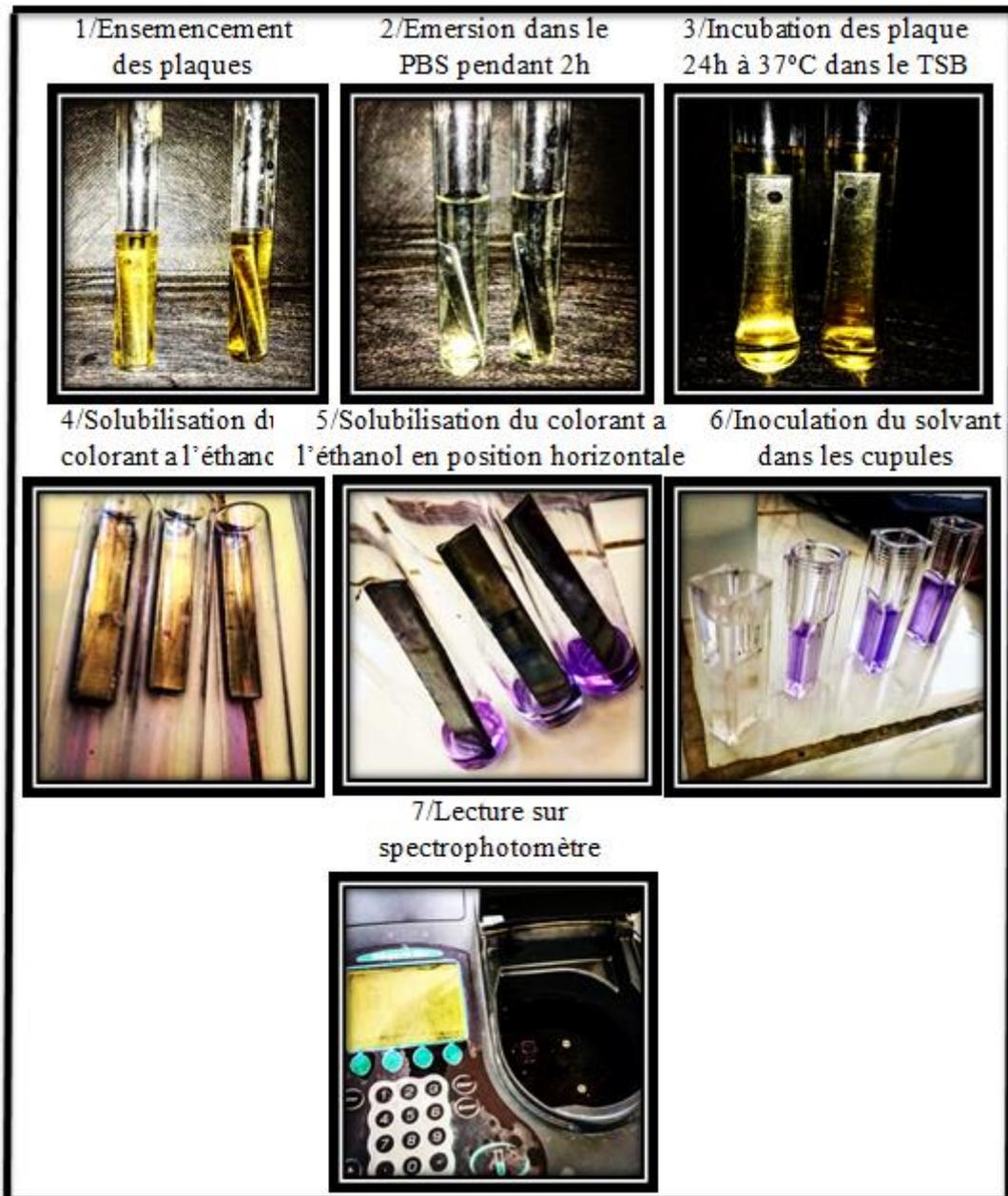
Cette technique a été effectu e suivant les travaux de (Lee *et al.*, 2015).

Chaque souche de Staphylocoque a été cultiv e dans 5 ml de TSB pendant 24h à 37 C, puis 1ml de chaque suspension bactérienne est transf r e dans des tubes à essai contenant 10ml de PBS (pH =7.4) et des lames d'inox (type 316 L, 5cm/ 2cm), les tubes sont incubés à 37 C pendant 2h pour permettre l'adhésion des cellules bactériennes à la surface des lames d'inox (figure 12).

Après 2h les lames s ch es sont immerg es dans des tubes contenant du TSB pendant 24h à 37 C, après cette durée d'incubation les lames sont lav es 3 fois à l'eau distill e stérile et

séché puis coloré par 1 ml de Crystal violet 0,5% pendant 2min, l'excès du Crystal violet est éliminé et les lames sont rincé à l'eau distillé stérile.

Le Crystal violet incorporé dans le biofilm est solubilisé par 1ml d'éthanol 99%. La densité optique est mesurée à 595nm au spectrophotomètre.



**Figure 12:** Etapes de la méthode de culture sur l'acier inoxydable (photo personnelle)..

## 6. Analyses statistiques

L'analyse des résultats est établie pour une analyse descriptive par le logiciel Microsoft Office Excel ®. Les données de l'analyse de rouge congo sont exprimées en mesure qualitative de production de Slime ou non, et celles du TCP et facteurs (NaCl) sont exprimées en moyenne.

Le test de Fisher exact a été utilisé pour comparer le taux de la positivité chez les différentes catégories des souches testées ainsi que les proportions trouvées chez les *S.aureus* et SCN. Les résultats des différences ont été jugés significatives si la probabilité trouvée est inférieure au seuil de 0.05 ( $P < 0.05$ ).

### Partie III : Résultats et Discussion :

Les résultats obtenus à l'issue de notre travail seront organisés en trois parties :

**Partie 1 :** les résultats présentés dans cette partie concernent l'identification et la revivification et des souches utilisées dans l'étude.

**Partie 2 :** Relative aux résultats des méthodes utilisées pour étudier le potentiel des souches à former de biofilm *in vitro*.

**Partie 3 :** Rapporte les résultats du l'effet du NaCl et l'hydrophobicité de la paroi bactérienne sur la capacité de former de biofilm ainsi que la culture sur l'acier inoxydable.

#### 1. Identification et revivification de souches utilisées :

Toutes les souches utilisées dans cette étude appartenant à genre *Staphylococcus*(62 souches). L'identification des espèces par la méthode MALDI-TOF MS a donné les résultats suivants : 50 souches de l'espèce *S.aureus* et 12 souches à coagulase négative (*S.saprophyticus* (4x), *S.haemolyticus*, *S.chromogenes*, *S.nepalensis*, *S.sciuri*, *S.simulans*, *S.succinus*, *S.warneri* et *S.xylosus*). Les souches de Staphylocoques utilisées dans la présente étude sont isolées des échantillons de diverses natures, incluant ceux d'origine animale et humaine et d'autres d'origine alimentaires. Les souches auparavant isolées des prélèvements nasaux (souches N) et les souches isolées des prélèvements médicaux (souches M) ont été regroupé comme souches d'origine humaine (Tableau 5).

**Tableau 05 :** Répartition des souches selon leur origine.

Souche animales (S)		Souches humaines (N+M)		Souches alimentaire (F)	
N=34		N= 19		N= 9	
<i>S. aureus</i>	SCN	<i>S. aureus</i>	SCN	<i>S. aureus</i>	SCN
22	12	19	0	9	0

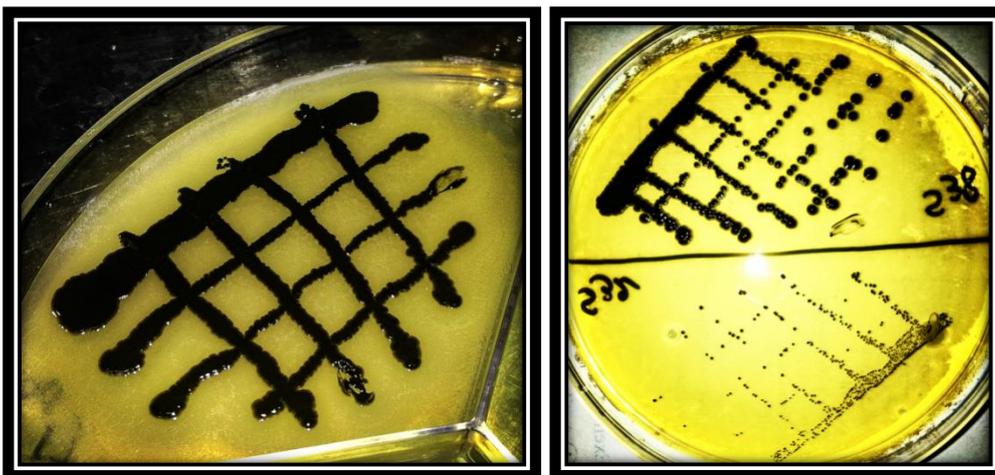
Malgré que les souches aient été identifiées par une méthode très précise de MALDI-TOF MS, qui donne l'espèce de bactérie avec exactitude. Mais, lors de conservation et le transport des souches, la possibilité des contaminations est souvent inévitables, pour cela, avant d'être testé pour leur potentiel de formation de biofilm, toutes les souches auparavant

conservées à la congélation ou par lyophilisation ont été activées et vérifiées selon leurs caractères cultureux et morphologiques.

Sur la Gélose Baird Parker, les colonies de *S.aureus* présentent un aspect macroscopique caractéristique souvent noires, grises à cause de la réduction du tellurite en tellure de potassium, brillantes, convexes entourées d'un halo d'éclaircissement du jaune d'œuf (2 à 5 mm de diamètre, correspondant à une protéolyse, à l'intérieur d'un halo, il peut apparaître une zone opaque due à l'action de lécithinase (Figure 13). Les colonies possèdent ces aspects sont dites colonies caractéristiques, tandis que les souches à coagulase négative sont souvent dépourvues de l'activité protéolytique ou lipidique, elles donnent des colonies non caractéristiques de l'aspect suivant : brillantes avec ou sans bord blanc étroit; la zone claire est absente ou à peine visible et l'anneau opalescent est absent ou à peine visible, soit des colonies grises dépourvues de zone claire.

Sur gélose nutritive, les colonies de *S.aureus* sont lisses, rondes, d'un diamètre 1 à 3mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune-orange) (Figure 14).

Sur Gélose Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques du genre *Staphylococcus* ont été prélevées, le développement bactérien sur le milieu de Chapman ne constitue qu'une indication. Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, si non les colonies sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre (Figure 15).



**Figure 13 :** Aspect des colonies des souches *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus* spp sur le milieu Baird Parker (photo personnelle).



**Figure 14 :** Aspect des colonies des souches *Staphylococcus aureus* sur le milieu GN (photo personnelle).



**Figure 15 :** Aspect des colonies des souches *Staphylococcus aureus* sur le milieu hypersalé au mannitol (Chapman) (photo personnelle)..

## 2. Résultats relative à l'étude de formation du biofilm :

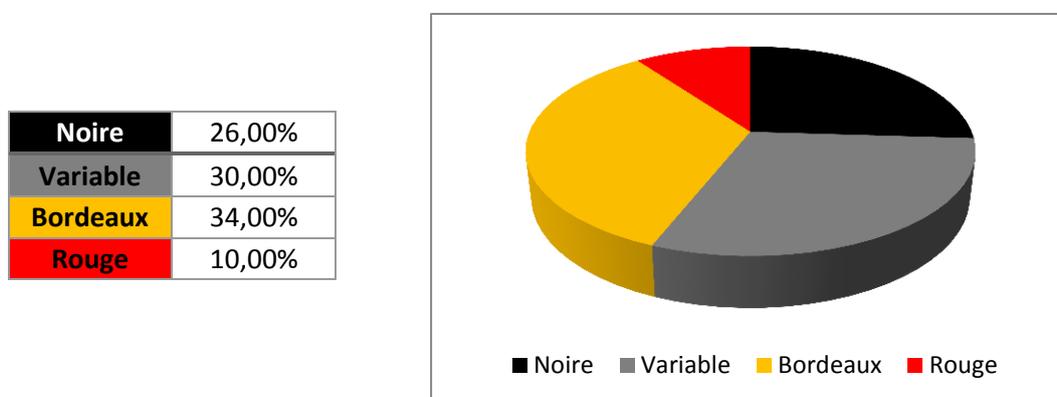
Dans cette étude, 62 souches suspectes d'être apte de produire du biofilm ont été isolées à partir d'échantillons humain, animale et alimentaire. La possibilité de production du biofilm est mis en évidence par l'utilisation Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilms *in vitro*, la méthode quantitative des microplaques 96 puits (Christensen *et al.*, 1985; Cucarella *et al.*, 2001) et la méthode qualitative du rouge congo(Freeman *et al.*, 1989; Snoussi *et al.*, 2008; Zmantar *et al.*, 2008).

## 2.1. Résultats de la méthode de Rouge Congo Agar (RCA) :

La figure 16 présente la répartition des résultats des aspects de colonies sur milieu Rouge Congo. Sur 50 souches de *S.aureus* testées, le taux des souches formatrices de slime selon la méthode RCA était de 56,00% soit un nombre de 28 souches de *S.aureus*. Ces souches qualifiées comme formatrices de slime possédants des phénotypes variables, à savoir : 13 (26%) souches ont données des colonies noires (parfois de consistance cristalline sèche) et 15 (30%) souches ont présentées des colonies noires à centre rouge ou rouge à centre noire.

Tandis que 22/50 souches de *S.aureus* étaient non productrices des slime soit un taux de 44%. Parmi ces souches présentent un caractère négative sur rouge Congo, un nombre de 17 souches ont données des colonies bordeaux soit un taux de (34%) et 5 souches avec des colonies rouges (10%).

Concernant les 12 souches SCN testées, 5 souches soit un taux de 41.67% étaient positives pour la formation de slime sur rouge Congo. Parmi ces souches, 3 présentait une couleur noire alors que 2 était de phénotype variable (rouge a centre noire). En revanche, 7SCN soit 58,33% étaient négatives dans les quelle 6 souche donnent des colonies rouges et une souche de couleur bordeaux.



**Figure 16:** Répartition des souches de *Staphylococcus aureus* selon l'aspect des colonies sur le milieu RCA.



**Figure 17** : Différentes aspects des souches de *Staphylococcus aureus* sur le milieu RCA  
(photo personnelle) .

(A) :Phénotype négatif, A1: Colonies rouges, , A2 :Colonies bordeaux,  
(B) : Phénotype positif, **B1** :Colonies noires regueuse aspect seche cristalline positif,  
**B2** :Colonies bordeaux presque noires, **B3** : colonie noire aspect lisse cristalline negatif.  
(C) : Phénotype variable, **C1** : Colonies noires à contour rouge, **C2** : Colonies rouges à contour noire.

**Tableau 06 :** Répartition de taux de formation de Slime des souches selon leurs origines (Méthode RCA Rouge Congo)

		Souche animales (S)			Souches humaines (N+M)			Souches alimentaires (F)			
		N=34		P <sub>S/SCN</sub>	N= 19		P <sub>S/N+M</sub>	N= 9		P <sub>S/F</sub>	P <sub>N+M/F</sub>
		S. aureus 22	SCN 12		S. aureus 19	SCN 0		S. aureus 9	SCN 0		
Formation Slime	+	13 (59,09%)	7 (41,67%)	1.00	12 (63,16%)	-	1.00	6 (66,67%)	-	1.00	1.00
	-	9 (40,90%)	5 (58,33%)		7 (36,84%)	-		3 (33,33%)	-		

Nos résultats montre que le taux de production de slime est plus élevé chez les *S.aureus* d'origine humaine( 63,16%) que chez les *S.aureus* d'origine animale (59,09%), néanmoins cette différence n'est pas significatif ( $P>0.05$ ), aussi le taux de formation de slime par les *S.aureus* d'origine alimentaire (66,67%) est supérieur à celui produit par les *S.aureus* d'origine animale et humaine (59,09% et 63,16% respectivement), cette différence est aussi non significative ( $P_{S/F}$  et  $P_{N+M/F} >0.05$ ). Les résultats montrent un taux de formation de slime plus élevé mais non significatif chez les *S.aureus* d'origine animale (59.09%) que les SCN (41.67%) ( $P_{S/SCN} >0.05$ ).

Le taux des souches de *S.aureus* productrices de slime (toute origine confondue) trouvé dans cette étude est (61,29%), est proche de celui rapporté par (Merghni *et al.*, 2015) qui ont trouvé que 70,6% des souches de *S.aureus* sont productrices de slime avec un phénotype positive ou variable sur le milieu RCA, alors que 29,4% souches sont de phénotype négatif.

En comparant l'aptitude de l'espèce *S.aureus* par rapport les autres espèces SCN, les résultats obtenus par la méthode RCA concordent avec ceux retrouvés par (Arciola *et al.*, 2001) où la production de slime (biofilm) était beaucoup plus importante chez les *S.aureus* par rapport au SCN (60,8% et 48,5%, respectivement).

(Vasudevan *et al.*, 2003) ont trouvés que 91,4% des isolats de *S.aureus* étaient productrices de Slime (formation des colonies noires typique dans les 24-48h), et toutes les isolats sont devenu productrices (slime positive) après 72h d'incubation. Ces valeurs rapportés par (Vasudevan *et al.*, 2003) sont plus élevées par rapport à nos résultats. Ces auteurs ont rapporté que la production du slime pour les *S.aureus* dépend de la période d'incubation.

L'aspect des colonies de *S.aureus* productrices de slime sur Gélose Rouge Congo par méthode RCA est dû à la production des exopolysaccharides qui réagissent avec le rouge

congo et confirme l'expression des facteurs PIA par les souches de *S.aureus* (**Vasudevan et al., 2003**). Le Slime est définie comme la substance polymérique extracellulaire, également connu sous le nom d'exo-polysaccharides (EPS), qui est principalement formé par PIA chez *S.epidermidis* et *S.aureus* (**Costerton et al., 1995**). La production des EPS joue un rôle important dans les infections causées par différents micro-organismes (**Alcaráz et al., 2003**), et est considérée comme un facteur de virulence important pour certains microorganismes tels que *Staphylococcus aureus*.

En matière d'hygiène alimentaire, la formation de biofilm par des souches alimentaires diminue l'efficacité des produits de désinfection. Et étant donné que dans cette étude les souches alimentaires sont généralement isolées de lait cru et viandes hachées, cela aggrave la situation, car tout le lait de mélange et tous les quantités de viandes hachées vendues aux consommateurs seront contaminées. Si ces souches sont entérotoxigènes, des toxi-infections alimentaires pourrait se déclencher.

Pour les souches d'origine humaines, nos résultats sont proches de ceux rapportés par (**Touati et al., 2007**) qui ont montré que 64,2% des souches responsables d'ILC (Infections Liées aux Cathéters) ont été productrices de slime contre 28,5% des souches de portage. Ils ont considéré que les souches productrices de slime avaient un phénotype variable ou positif. Au milieu hospitalier, les souches de *S.aureus* colonisent des surfaces variables comme les filtres de climatiseurs, les paillasses, les lits d'accouchement, et même les dispositifs médicaux comme les sondes et les cathéters. Ce constat rendre les opérations de stérilisation et désinfection difficiles et inefficaces, et facilite le déclenchement et la dissémination des maladies nosocomiales parfois rebelles aux traitements.

Pour les souches de *S.aureus* d'origine animale, nos résultats sont élevée à ceux trouvés par (**Krukowski et al., 2008**) qui ont indiqué que, 42,37 % des isolats de *S.aureus* isolées de la sécrétion inflammatoire des glandes mammaires bovines sont productrices de Slime. Aussi supérieur de ceux de (**Ciftci et al., 2009**) ont trouvé que parmi les 59 souches de *S.aureus* 22 (37,2%) sont productrices de colonies noires après 24-48h. Après 72h n'y avaient pas des souches productrices de colonies noires.

Le taux de souches SCN formatrices de slime trouvé dans notre étude (41,67%) est plus faible de celui rapporté par (**Chaieb et al., 2005**) qui ont trouvé que parmi des isolats cliniques, un taux de 50% de *S.epidermidis* sont productrices de colonies noires alors que 50% souches sont non productrices de slime formant des colonies rouges ou bordeaux.

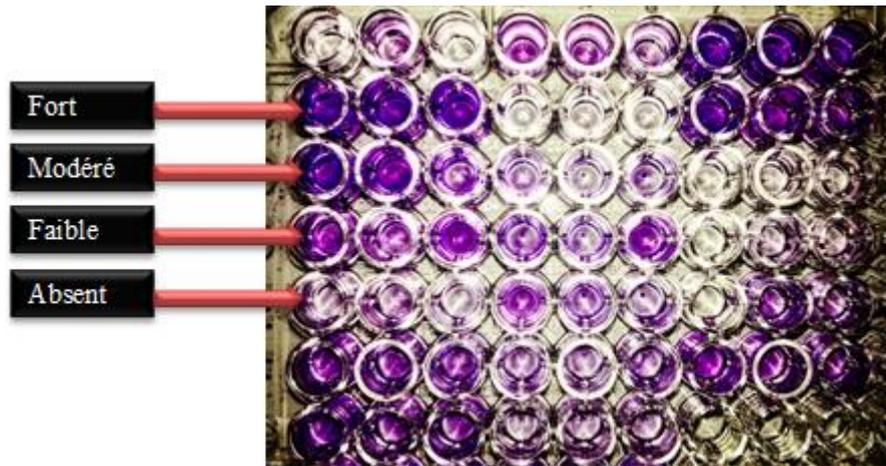
Selon (**Kara Terki, 2014**), la recherche de la production de slime sur RCA a révélé que 56,8% des souches de *S.aureus*, 53,5% des souches de *S.epidermidis* et 63,4% des souches de *S.saprophyticus* sont productrices de slime. Les SCN ont été souvent marginalisés et considérés comme des contaminants et non pathogènes, mais leur aptitude à former de slime est inquiétante surtout en pathologie animale et en milieu hospitalier.

La technique de Rouge Congo utilisée pour la détection de formation de biofilm est une méthode subjective, basée sur l'observation et l'estimation des couleurs des colonies. En fait, le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires sur milieu RCA contrairement aux colonies non productrices qui restent rouges. Selon plusieurs auteurs (**Mathur et al., 2006; Oli et al., 2012**), la méthode de Rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm *in vitro*. Dans la même tendance, (**Taj et al., 2012**) ont montré que le dépistage par la technique du Rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation du biofilm.

La technique de Rouge Congo utilisée pour la détection de formation de biofilm présente l'avantage d'être rapide et peu coûteuse, mais elle présente quelques problèmes de reproductibilité. En fait, l'aspect des colonies peut se changer selon quelques facteurs donnant des aspects non habituels ou difficile à interpréter. (**Mathur et al., 2006**) ont trouvé que parmi les 8 souches de Staphylocoques isolées, 3 (1,97%) présentaient des colonies noires sans consistance sèche et 5 (3,2%) des souches étaient des colonies rouges avec la consistance sèche. De même ils ont découvert que le PIA qui influence sur la formation de *Staphylococcus aureus* ne peut pas être détecté par la méthode du Rouge Congo.

## **2.2. Résultats de la méthode de culture de tissu (TCP):**

Cette technique de quantification est une méthode indirecte d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (**Djordjevic et al., 2002**). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (**Musk et al., 2005**) (Figure 18).



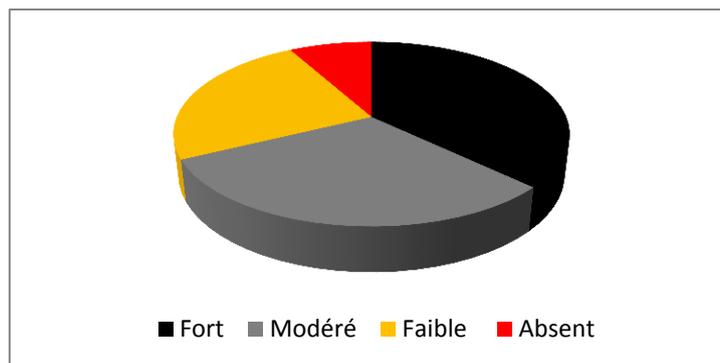
**Figure 18 :** Formation du biofilm sur microplaque 96 puits (méthode TCP) (photo personnelle).

D'après l'analyse des résultats et par comparaison des différentes valeurs de densité optique (DO) pour chacune des souches étudiées avec la DO de témoin (control négatif), la densité optique obtenue par 55/62 souches (88,70%) est élevée à celle de témoin, ce qui traduit leur potentiel de former un biofilm.

La DO de 23/62 souches (37,10%) est 4 fois plus élevées que la DO de témoin ( $DO_{lue} > 4 \times DO_{onc}$ ) pour chaque souche, ceci indique que ces souches ont un haut potentiel à former le biofilm donc ces souches sont classées comme fortement formatrices de biofilm. La DO de 19/62 souches (30,65%) est comprise entre : ( $2 \times DO_{onc} < DO_{lue} \leq 4 \times DO_{onc}$ ) pour chaque souche, ceci indique un potentiel à former le biofilm de manière modérée donc ces souches sont classées comme modérément adhérentes à la surface des microplaques. La DO de 15/62 souches (24,19%) présentait une DO comprise entre ( $DO_{onc} < DO_{lue} \leq 2 \times DO_{onc}$ ) pour chaque souche, indiquant une faible formation de biofilm, ces souches sont classées comme des souches faiblement formatrices de biofilm.

La densité optique des 5/62 souches (8,06%) était moins que celle du témoin ( $DO_{lue} \leq DO_{onc}$ ) ce qui traduit leur incapacité de former un biofilm (absence de formation) (Figure 19).

<b>Fort</b>	37,10%
<b>Modéré</b>	30,65%
<b>Faible</b>	24,19%
<b>Absent</b>	08,06%



**Figure 19:** Répartition des taux de formation de biofilm par les souches de Staphylocoques selon les valeurs moyennes de DO.

Plusieurs études ont été effectuées afin de mettre en évidence les stratégies employées par les micro-organismes pour produire du biofilm, ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou *et al.*, 2009).

La détection précoce des biofilms à Staphylocoques peut être l'une des étapes essentielles pour la prévention et la gestion des infections urinaires nosocomiales sur sondes (Martín-López *et al.*, 2002).

Selon notre étude, un taux de 88,70% des souches de Staphylocoques (toute origine confondue) sont formatrices de biofilm selon la méthode TCP. (Melo *et al.*, 2012) ont trouvé que 93 souches parmi 94 souches (98,9%) sont productrices de biofilm par méthode TCP.

Dans cette étude toutes les souches isolées alimentaires étaient formatrices de biofilm (100%). Par contre, pour les souches *S.aureus* humaines un taux de 94,74% était formatrice de biofilm et une seule souche était non formatrice de biofilm et pour les souches *S.aureus* d'origine animale, un taux de 95,46% de positivité est trouvée. En comparant les taux de positivité par méthode TCP chez les trois catégories des souches, aucune différence significative n'a été trouvée ( $P_{S/M+N}$ ,  $P_{S/F}$  et  $P_{F/M+N} > 0.05$ ). Concernant les souches d'origine animale, le taux de positivité chez SCN est significativement plus inférieur à celui trouvé chez les *S.aureus* d'origine ( $P < 0.05$ ).

Dans une étude récente, (Neopane *et al.*, 2018) ont montré que parmi les 43 isolats cliniques de *Staphylococcus aureus*, la détection de formation de biofilm par la méthode TCP

a révélé que 30 (69,8%) sont productrices de biofilm dont les quelles 3 (6,97%) sont fortement formatrices, 12 (27,90%) sont modérées et 15 (34,88%) sont faiblement formatrices de biofilm.

**Tableau 07:** Répartition de taux de formation de biofilm des souches selon leurs origines (Méthode TCP)

		Souche animales (S)			Souche humaines (M+ N)			Souche alimentaires (F)			
		N=34		P <sub>S/SCN</sub>	N=19		P <sub>S/M+N</sub>	N=9		P <sub>S/F</sub>	P <sub>F/M+N</sub>
		<i>S.aureus</i> 22	SCN 12		<i>S.aureus</i> 19	SCN 0		<i>S.aureus</i> 19	SCN 0		
Formation biofilm	Absence	1 (4,54%)	4 (33,33%)	0.041	1 (5,26%)	-	1	0	-	1	1
	Faible	4 (18,18%)	3 (25,00%)		5 (26,32%)	-		0	-		
	Modéré	12 (54,55%)	3 (25,00%)		4 (21,05%)	-		2 (22,22%)	-		
	Forte	5 (22,73%)	2 (16,67%)		9 (47,37%)	-		7 (77,78%)	-		

En comparant l'aptitude de l'espèce *S.aureus* par rapport les autres espèces SCN, les résultats obtenus par la méthode TCP montrent que 66,67% des SCN d'origine animale sont formatrices de biofilm par rapport 96% de *S.aureus*. (Kara Terki, 2014) A trouvé que 60/200 (30%) des souches sont productrices de biofilm avec un taux de 48% chez les souches de *S.epidermidis* et 40,5% chez *S.aureus*.

l'étude de (Nasret *al.*, 2012; Agarwal and Jain, 2013) ont montré une augmentation significative de la production de biofilm par des isolats cliniques de *Staphylococcus* spp lorsqu'ils sont exposés à des concentrations de glucose différentes, ce qui pourrait expliquer la formation du biofilm par les souche SCN.

Selon notre étude un taux relativement élevé (77,78%) des souches alimentaire est été qualifiés comme fortement productrices par rapport aux autres catégories des souches humaines et animales où les souches sont majoritairement jugées comme moyennement ou faiblement productrices de biofilm. Selon l'étude (Kara Terki, 2014) seulement deux souches étaient classées comme fortement productrices de biofilm et 58 modérées.

La technique TCP est la plus largement utilisée et est considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm. Cette méthode a été rapportée comme étant la plus sensible, précise et reproductible pour la détermination de la formation de

biofilm à Staphylocoques. Elle permet une détermination quantitative pour comparer l'adhésion des différentes souches et aussi examiner un grand nombre d'isolats simultanément(Nasr *et al.*, 2012; Kara Terki, 2014)

Cependant, d'autres auteurs suggèrent que cette méthode peut être moins précise pour déterminer la capacité des souches à sécréter le slime bactérien (Melo *et al.*, 2013). Pour cette raison (Nasr *et al.*, 2012) ont proposé la méthode de culture sur RCA comme une alternative à la méthode TCP pour le dépistage de la formation de biofilm par les Staphylocoques étant plutôt facile à réaliser, elle prend moins de temps et plus est sensible et spécifique(Nasr *et al.*, 2012).

Des méthodes comme l'étude de formation de slime sur rouge Congo CRA, ainsi que le test au TCP sont bien établis pour la détection de la formation de biofilms chez des SCN comme *S.epidermidis* (Deighton *et al.*, 2001). Néanmoins, l'utilisation de ces tests pour caractériser la formation de biofilm de *S.aureus* a conduit à des résultats contradictoires par différents chercheurs (Knobloch *et al.*, 2002).

La formation de biofilm est un phénomène complexe sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels : la surface à coloniser, le milieu environnant et les microorganismes (Branger, 2007). La formation de biofilm aussi dépend de plusieurs facteurs de régulation génétique(Manna *et al.*, 1998) ;(Shenkman *et al.*, 2001). Dans cette étude le gène *sarA* codant la protéine *sarA* été détecté par puce à ADN chez la totalité des souches testées. Autre des facteurs comme le système *agr* influence également le comportement de *S.aureus* en biofilm et contribue à la formation de biofilm (Yarwood and Schlievert, 2003). Dans notre étude, les souches testées possédant les différents gènes de système *agr* (*agrA*, *agrB*, *agrC* et *agrD*) avec ces différents allèles I, II, III, IV.

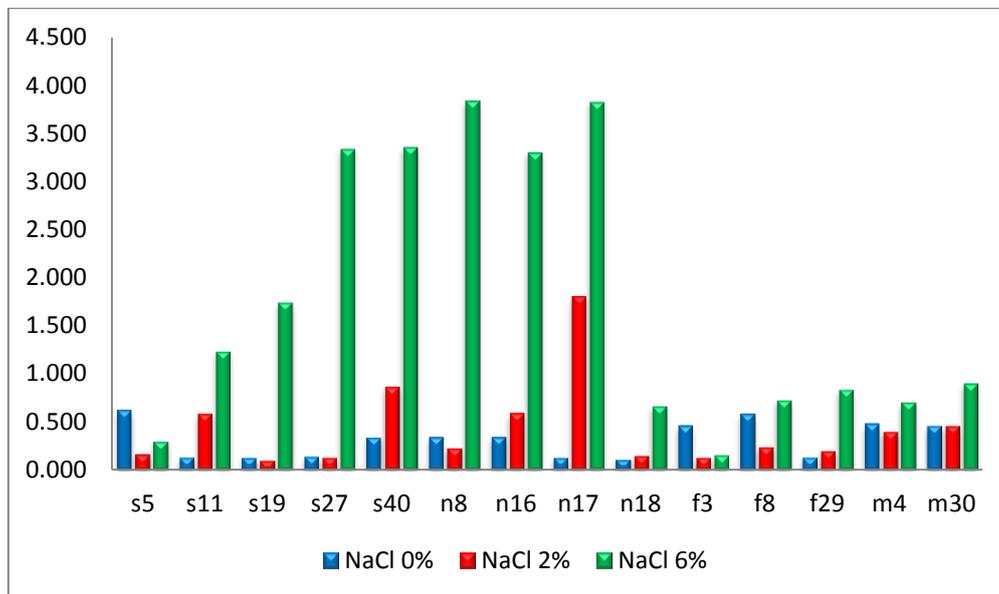
Malgré que les gènes responsables de formation de *icaA*, *icaC*, *icaD* ont été détecté chez la totalité des souches testées, mais la production de biofilm *in vitro* dépend d'un certain nombre de facteurs physiques et chimiques, tels que la composition de la culture, température, pH, oxygène...etc(Harjai *et al.*, 2005; Di Bonaventura *et al.*, 2007; Hostacka and Ciznar, 2007).

### **3. Effet de NaCl sur la formation de biofilm par les *Staphylococcus spp*:**

Après finalisation des résultats d'étude de formation de biofilm des souches de Staphylocoques isolées à partir de différents origine par les technique précédente, on a

sélectionné un nombre total de 14 souches afin d'explorer l'effet de quelques facteurs sur la formation de biofilm.

Deux concentrations de NaCl ont été testées 2% et 6%. Selon les résultats présentés dans la Figure 20, les souches étudiées de Staphylocoques tolèrent la concentration élevée de NaCl.



**Figure 20:** Effet d'NaCl 2%, 6% sur la formation du biofilm par 14 souches de Staphylocoques sélectionnés.

En ce qui concerne l'effet de 2% de NaCl sur la formation du biofilm par les Staphylocoques les résultats montrent que 10/14 (71,43%) des souches sélectionnées sont formatrices de biofilm, ces souches se répartissent comme suit : 4/10 souches (40%) (S5, N8, F8, F29) ont montré une DO supérieure à celle de la DO du contrôle négatif ( $DO_{lue} > DO_{onc}$ ) ceci indique un faible potentiel de formation de biofilm, 4/10 souches (40%) (S11, N16, M4, M30) présentent des DO comprises entre ( $2 \times DO_{onc} \leq DO_{lue} \leq 4 \times DO_{onc}$ ) qui s'interprète comme des souches ayant un taux modéré de formation de biofilm et 2/10 souches (20%) (S40, N17) qui ont montré une densité optique quatre fois plus supérieure que celle du contrôle négatif ( $DO_{lue} > 4 \times DO_{onc}$ ) cela les classe comme des souches fortement adhérentes.

4/14 souches (28,57%) (S19, S27, N18, F3) ont présenté une densité optique inférieure à celle du contrôle négatif ( $DO_{lue} \leq DO_{onc}$ ) indiquant leur incapacité à s'adhérer (absence de formation de biofilm).

En ce qui concerne les résultats d'effet de 6% de NaCl sur la formation du biofilm par les souches de *Staphylococcus* spp, 13/14 (92,86%) sont révélés formatrices de biofilm, ces souches se répartissent comme suit : 12/13 souches présentent une DO quatre fois plus supérieure à celle du contrôle négatif ( $DO_{lue} > 4 \times DO_{onc}$ ), et une seule souche présente une DO supérieure à celle du contrôle négatif ce qui la regroupe comme faiblement adhérente (formation faible de biofilm).

1/14 souche (7,14%) (F3) a présenté une DO inférieure à celle du contrôle négatif ( $DO_{lue} \leq DO_{onc}$ ) indiquant son incapacité à s'adhérer (non formatrice de biofilm).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Lee *et al.*, 2014), qui ont montré une augmentation significative de formation du biofilm par les souches des *Staphylococcus aureus* après leur exposition à des concentrations de NaCl 0%, 2%, 4% et 6%, ainsi, les cellules de *S.aureus* ont montré un pic de formation de biofilm en 4% de NaCl et une légère diminution en ce qui concerne la formation du biofilm lorsque la concentration de NaCl atteint 6%, toutefois le taux de biofilm formé reste supérieur à celui formé en 0% et 2% de NaCl.

Aussi (Xu *et al.*, 2010) a montré dans une étude que l'agrégation cellulaire chez les souches de *S.aureus* augmente lors d'une exposition à des concentrations élevées de NaCl arrivant jusqu'à 10%.

Des travaux réalisés sur type de bactéries, (Yoon *et al.*, 2013) ont évalué l'effet de NaCl sur le biofilm de *Salmonella*. Dans l'étude, la coloration au cristal violet a révélé que le biofilm de *Salmonella* augmentait avec la concentration de NaCl. Ces données suggèrent donc que l'effet de NaCl sur les biofilms est dépendant de bactéries. En fait les Staphylocoques sont des bactéries halophiles, qui tolèrent et préfèrent des concentrations élevées en NaCl par rapport aux autres bactéries. Ce résultat suggère que les fortes concentrations de NaCl dans les matrices alimentaires augmentent la possibilité de formation du biofilm des *S.aureus*.

Ce résultat suggère que le gène *icaA* est régulé positivement par NaCl et une adhésion intercellulaire accrue, ce qui pourrait entraîner une formation accrue de biofilm de *S.aureus* aux concentrations de NaCl à 4% et 6%. D'autres études ont rapporté que le gène *rbf* favorise la formation de biofilm de *S.aureus* en réprimant *icaR*, qui est un régulateur négatif d'*icaA* et que le *rbf* régule de manière positive la formation de biofilm en réponse à de fortes concentrations de NaCl (Lim *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2013).

En général, la quantité de biofilm formée augmente avec la concentration de NaCl de 2% à 6%. Ces résultats indiquent que la capacité de formation de biofilms est dépendante de facteurs environnementaux (**Rode et al., 2007; Xu et al., 2010**).

D'autre part, l'addition de NaCl au milieu TSB (supérieur à 6%) a conduit à des changements extrêmes dans le comportement de la formation de biofilms par les souches étudiées. Ceci pourrait être expliqué par ceux mentionnés par (**Csonka and Epstein, 1996**). Ils ont rapporté que la concentration élevée en sel dans un milieu de croissance, peut entraîner une baisse de l'activité de l'eau du milieu environnant. Cette baisse de l'activité de l'eau peut perturber les activités cellulaires normales. Par conséquent, cette observation suggère que la dérive osmotique influence la production de biofilms.

Dans ce cas, la formation de biofilms par ces bactéries peut jouer un rôle très important dans la qualité hygiénique des aliments et ne dépend pas seulement des bases génétiques et leurs régulations, mais aussi des propriétés du substrat et des cellules bactériennes ainsi que des facteurs environnementaux (la température, les nutriments et la surface) (**Rode et al., 2007; Lee et al., 2015**).

Cependant, (**Yoon et al., 2013**) suggère que les études utilisant la méthode de coloration au Crystal Violet pour quantifier le biofilm formé, cette méthode ne peut pas distinguer entre les cellules vivantes et les cellules mortes. Bien qu'il existe des cellules mortes due au stress dans certains biofilms, cette méthode montre ces cellules comme une partie du biofilm. Ainsi une méthode qui distingue les cellules mortes des cellules vivantes dans le biofilm est nécessaire pour évaluer l'effet du NaCl sur la formation du biofilm par les *S.aureus*.

#### **4. Relation entre les gènes *icaA*, *icaC*, *icaD* et *bap*, et la formation de biofilm par les techniques RCA et TCP:**

La formation du biofilm implique la production d'un polysaccharide extracellulaire ou PIA responsable de l'établissement du contact interbactérien et de l'accumulation de ces bactéries en couches superposées. La synthèse de ce polysaccharide dépend de l'expression de l'opéron chromosomique *ica* (**Rachid et al., 2000; Kara Terki, 2014**).

Le locus *ica* comprend les quatre gènes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *eticaC* qui sont co-transcrits à partir du promoteur d'*icaA* et le gène régulateur *icaR* situé en amont (**Heilmann et al., 1996; Cramton et al., 1999; Götz, 2002**).

La protéine **Bap** constitue une nouvelle famille de protéines qui joue un rôle clef dans la formation de biofilm chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Lasa and Penadés, 2006**). Cette protéine est impliquée à la fois dans l'adhésion intercellulaire mais aussi dans l'attachement primaire à une surface abiotique. Elle est codée par le gène *bap*. En absence de PIA, la protéine *Bap* est suffisante pour induire la formation de biofilm sur les surfaces abiotiques chez *S.aureus* (**Cucarella et al., 2004**).

La relation entre l'expression des gènes *ica A icaC, icaD, bap*, la formation de biofilm par la méthode TCP et la production de slime bactérien par la méthode RCA. Cette relation est représentée dans les tableaux (08, 09, 10 et 11).

La détection des gènes *icaA, icaC, icaD, bap* a été réalisée pour toutes les souches isolées par la technique de puces à ADN expliquée auparavant. Selon ces tableaux, on a remarqué que les 62 souches de Staphylocoques étudiées ne possèdent pas le gène *bap*. Il semblerait que la prévalence de ce gène soit faible chez *S.aureus* puisque aucun isolat sur une collection de 262 isolats d'origine animale ou humaine ne possède ce gène (**Vautor et al., 2008**). Pour cela, on a axé notre étude que sur les gènes *icaA, icaC, icaD*.

#### **4.1. Méthode TCP :**

Selon les tableaux 08, 09, et 10, nous constatons que parmi les 50 souches de *S.aureus icaA+/icaC+ icaD+*, 48/50 étaient formatrices du biofilm, dont 21/50 souches étaient fortement formatrices, 16/50 formaient le biofilm modérément, 11/50 étaient faiblement formatrices. Alors que, les 2/50 souches restantes, ne forment pas du biofilm.

Selon plusieurs auteurs, ceci pourrait être dû à de nombreuses raisons telles que :

- L'inactivation de l'opéron *ica* par insertion de l'élément IS256 dans le gène *ica* (**Ziebuhr et al., 1999; Touati et al., 2007**).
- L'action du répresseur *icaR* qui est un répresseur de transcription de l'opéron *ica* chez les Staphylocoques (**Conlon et al., 2002**), ou la régulation post-transcriptionnelle (**Dobinsky et al., 2003**).

Ce variant « biofilm négatif » selon (**Ziebuhr et al., 1999**) est important pour le détachement des cellules bactériennes du biofilm et pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Ces variantes contribuent ainsi à la survie bactérienne et à la croissance dans des conditions environnementales changeantes (**Kara Terki, 2014**).

Selon le tableau 11, nous constatons que parmi les 12 souches de SCN *icaA-icaC-* et *icaD-*, 9/12 souches formaient du biofilm, dont 2/12 souches étaient fortement formatrices, 3/12 formaient le biofilm modérément, 4/12 était faiblement formatrice. Les 3 souches restantes, ne forment pas du biofilm.

#### 4.2. Méthode RCA :

Parmi les **50 souches *icaA+/icaC + eticaD+*, 28/50** étaient productrices de slime, alors que les **22/50** souches restantes sont non productrices.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Arciola *et al.*, 2006; El-Mahallawy *et al.*, 2009; Kara Terki, 2014) qui ont trouvé une forte corrélation entre la présence des gènes *ica* et la production de slime par la culture sur milieu RCA par rapport à la méthode de TCP.

Pour les souches de SCN présentant *icaA-, icaC- eticaD -*, 5/12 souches étaient productrices de slime, alors que les autres 7 souches ne le produisaient pas.

Selon le tableau 11, on a remarqué que 9/12 souches de SCN qui ne possèdent aucun gène codant pour les protéines de formation du biofilm, formaient du biofilm par la méthode TCP alors que 5/12 produisaient du slime par la méthode RCA.

(Cucarella *et al.*, 2001; Otto, 2004; von Eiff *et al.*, 2005) estiment que l'absence du locus *ica* chez certaines souches de Staphylocoques ne signifie pas qu'elles ne forment pas de biofilms, d'autres facteurs pourraient être responsables de ce mécanisme comme la protéine extracellulaire AAP (Protéine Associée à l'Accumulation). D'autres protéines et de l'ADN extracellulaire jouent alors le rôle du PIA (Lister and Horswill, 2014).

**Tableau 08 :** Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de slime par les méthodes RCA et TCP (souches humaines).

Souche	( <i>inaA</i> )	( <i>icaC</i> )	( <i>icaD</i> )	( <i>bap</i> )	RCA	Slime	TCP	Production
N1	positif	Positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,504	++
N2	positif	Positif	positif	Négatif	Rouge	Non	0,128	+/-
N3	positif	Positif	positif	Négatif	Bordeaux N	Formatrice	0,265	+
N5	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rouge	Non	0,316	+
N6	positif	Positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,143	+/-
N8	positif	Positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,341	++
N9	positif	Positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,283	+
N11	positif	Positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,467	++
N12	positif	Positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,139	+/-

N13	positif	Positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,470	++
N14	positif	Positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,146	+/-
N15	positif	Positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,447	++
N16	positif	Positif	Positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,341	++
N17	positif	Positif	Positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,127	+/-
N18	positif	Positif	Positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,107	-
M4	positif	Positif	Positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,480	++
M30	positif	Positif	Positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,456	++
M39	positif	Positif	Positif	Négatif	Rouge	Non	0,233	+
M59	positif	Positif	Positif	Négatif	CREN	Formatrice	1,021	++

CNER : centre noire extrémité rouge, CREN : centre rouge extrémité noire, - : non formatrice de biofilm, +/- : faiblement formatrice de biofilm, + : modérément formatrice de biofilm, ++ : fortement formatrice de biofilm.

**Tableau 09:** Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de slime par les méthodes RCA et TCP (souches alimentaires).

Souche	(inaA)	(icaC)	(icaD)	(bap)	RCA	Slime	TCP	Production
F3	Positif	positif	Positif	Négatif	Rouge	Non	0,462	++
F7	Positif	positif	Positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,431	++
F8	Positif	positif	Positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,580	++
F13	Positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,490	++
F15	Positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,420	++
F23	Positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,592	++
F29	Positif	positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,132	+/-
F38	Positif	positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,495	++
F47	Positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,183	+/-

CNER : centre noire extrémité rouge, CREN : centre rouge extrémité noire, - : non formatrice de biofilm, +/- : faiblement formatrice de biofilm, + : modérément formatrice de biofilm, ++ : fortement formatrice de biofilm.

**Tableau 10 :** Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de slime par les méthodes RCA et TCP (souches mammites ovines).

Souche	(inaA)	(icaC)	(icaD)	(bap)	RCA	Slime	TCP	Production
S2	positif	positif	positif	Négatif	CNER	Formatrice	0,286	+
S3	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,418	+
S4	positif	positif	positif	Négatif	CNER	Formatrice	0,189	+
S5	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,620	++
S6	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,240	+
S7	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,302	+
S8	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,227	+/-
S9	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,354	++
S10	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,372	+
S12	positif	positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,232	+

S13	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,287	+
S14	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,325	++
S17	positif	positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,298	+
S18	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,303	+
S19	positif	positif	positif	Négatif	Rouge	Non	0,128	+/-
S20	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,354	+
S21	positif	positif	positif	Négatif	CREN	Formatrice	0,369	+
S22	positif	positif	positif	Négatif	Bordeaux	Non	0,110	-
S25	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,866	++
S26	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,699	++
S29	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,219	+/-
S30	positif	positif	positif	Négatif	Noire	Formatrice	0,134	+/-

CNER : centre noire extrémité rouge, CREN : centre rouge extrémité noire, - : non formatrice de biofilm, +/- : faiblement formatrice de biofilm, + : modérément formatrice de biofilm, ++ : fortement formatrice de biofilm.

**Tableau 11** : Relation entre la présence des gènes de formation de biofilm et la production de slime par les méthodes RCA et TCP (souches mammites ovines) chez les SCN.

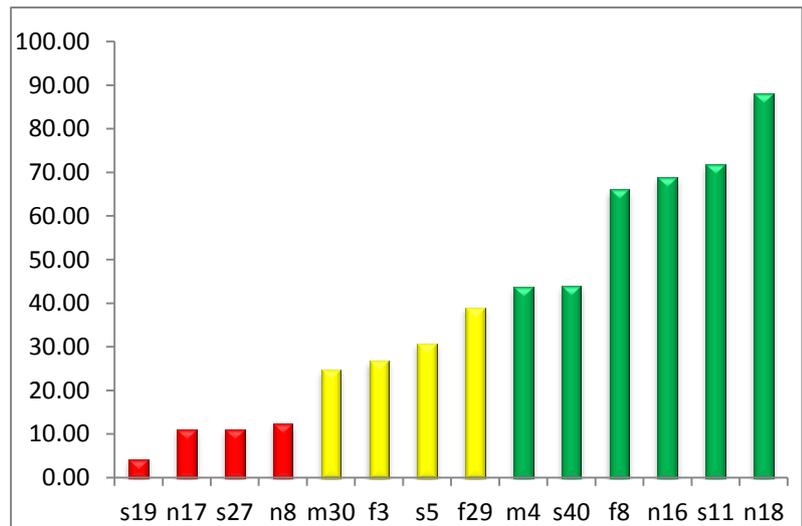
Souche	(inaA)	(icaC)	(icaD)	(bap)	RCA	Slime	TCP	Production
S1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rouge	Non	0,120	-
S11	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rouge	Non	0,132	+/-
S23	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Bordeaux	Non	0,164	+
S24	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Noire	Formatrice	0,554	++
S27	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rouge	Non	0,219	+/-
S30	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	CNER	Formatrice	0,110	-
S32	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rouge	Non	0,104	-
S34	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Noire	Formatrice	0,644	++
S36	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Noire	Formatrice	0,515	+
S38	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	CNER	Formatrice	0,148	+/-
S40	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rouge	Non	0,338	+
S41	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Rouge	Non	0,171	+/-

CNER : centre noire extrémité rouge, CREN : centre rouge extrémité noire, - : non formatrice de biofilm, +/- : faiblement formatrice de biofilm, + : modérément formatrice de biofilm, ++ : fortement formatrice de biofilm.

### 5. Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne des *Staphylococcus* spp par la technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) :

Les résultats obtenues par la méthode MATH indiquent que sur les 4/14 (28,57%) souches sont hydrophiles avec un pourcentage de CSH qui varie entre 4,26% et 12,29%. Les souches moyennement hydrophobes sont en nombre de 4/14 (28,57%) avec un pourcentage de CSH compris entre 24,69% et 39% et enfin 6/14 (42,86%) souches sont hydrophobes avec un pourcentage de CSH allant de 43,74% à 88,12% (Figure 21).

Noire	42,86%
Variable	28,57%
Rouge	28,57%



**Figure 21** : Pourcentage d'affinité des souches de *Staphylococcus* spp a l'héxadécane.

Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (**Jana et al., 1999; Cappello and Guglielmino, 2006**). L'hydrophobicité chez les bactéries à Gram positives et dû à la partie de lipide d'acide lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule, ayant pour résultat une surface hydrophobe(**Frank, 2001**).

Nos résultats montrent que la majorité des souches de *Staphylococcus* spp d'origine confondue sont hydrophobes 10/14 (71,43%), parmi les quelle 4 (40%) souches sont moyennement hydrophobe et 6 (60%) souche sont fortement hydrophobe et enfin 4 (28,57%) souches sont hydrophile.

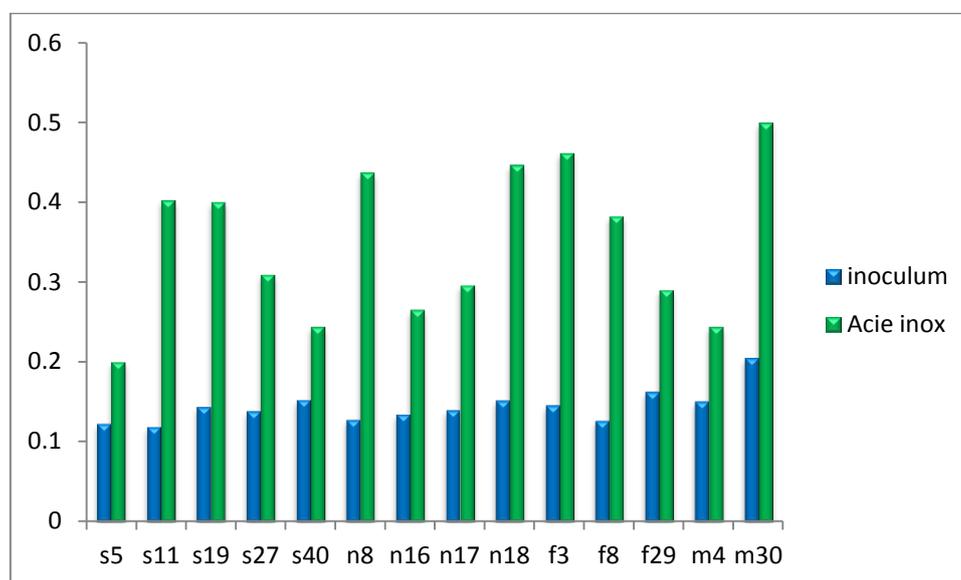
(**Di Ciccio et al., 2015**)ont démontré que: parmi les 67 souches de *Staphylococcus* spp testées à 37°C (64,1 %) sont des souches hautement hydrophobe, (31,3 %) des souches modérément hydrophobes et (4,4 %) sont des souches hydrophiles.

(**Mamo et al., 1987**) Ont trouvés 33% souches de *S.aureus* isolées de mammite bovine sont hydrophobe, 28% étaient modérément hydrophobe et 26% étaient hydrophile.

Les résultats obtenus dans notre étude sur l'affinité des souches de *Staphylococcus* spp pour l'héxadécane montrent que nos souche présentent des valeurs légèrement inférieur à celle trouvé par (**Di Ciccio et al., 2015**), et plus au moins plus élevé que celles trouvé par (**Mamo et al., 1987**).

## 6. Evaluation de la capacité des souches à former le biofilm sur l'acier inoxydable :

A partir des résultats des DO obtenu des lames d'inox et en les comparant à la DO des inoculas, on constate une augmentation significatif de la DO chez 11/14 souches et 3/14 souche ou il y'a une faible augmentation de la DO (Figure 22)



**Figure 22 :** Potentiel de formation du biofilm sur acier inoxydable par les souches de *Staphylococcus* spp

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenu par (Lee *et al.*, 2015), qui ont montré un taux de formation de biofilm sur les surfaces abiotique est significativement déférentes au niveau des souches. Dans cette étude, 4/19 souches ont montré un taux de formation de biofilm plus élevé sur polystyrène polypropylène, verre et inox respectivement, sur TSB la formation du biofilm est plus élevée sur le verre et inox que sur polypropylène et polystyrène.

Les résultats d'étude de (Lee *et al.*, 2015) conforme que le potentiel de formation du biofilm sur les surfaces abiotique diffère parmi les souche.

## 7. Relation entre les techniques TCP, MATH et culture sur inox :

En comparant les résultats obtenus des techniques TCP, MATH, et culture sur INOX, on constate que le taux de formation du biofilm pour les souches hydrophiles est plus élevé sur inox que sur microplaque, alors que pour les souches hydrophobes et moyennement hydrophobes le taux de formation du biofilm est variable (Tableau 12).

L'inox est hydrophile avec une surface chargé négativement(Frank, 2001; Ban *et al.*, 2014). Nos résultats sont en accord avec (Jo *et al.*, 2010; Bonsaglia *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015) qui

suggère que les bactéries s'adhère et forme le biofilm plus efficacement sur les surface hydrophile comme l'inox et le verre que sur les surface hydrophobique tel que le plastique

les résultats d'étude de (Van Houdt and Michiels, 2010) indique que le potentiel de formation du biofilm sur différentes surfaces est significativement différent parmi les souche, les propriétés de la surface tel que la rugosité et l'hydrophobicité influence le pouvoir des cellule a s'adhéré au surfaces.

Selon(Xu *et al.*, 2010) l'hydrophobicité et l'auto-agrégation augmente le taux de formation de biofilm durant la période d'incubation.

**Tableau 12:** Relation entre l'hydrophobicité et la formation du biofilm sur microplaque et inox par les méthodes TCP MATH et culture sur inox.

Souche	TCP	Production	CSH	Hydrophobicity	Inoculum	Inox
S5	0,620	+	30,83%	MH	0,122	0,2
S11	0,132	+/-	71,81%	Hydrophobe	0,118	0,402
S19	0,128	+/-	04,26%	Hydrophile	0,143	0,400
S27	0,142	+/-	11,11%	Hydrophile	0,138	0,309
S40	0,338	+	44,00%	Hydrophobe	0,152	0,244
N8	0,341	++	12,29%	Hydrophile	0,127	0,437
N16	0,341	++	68,83%	Hydrophobe	0,134	0,265
N17	0,127	+/-	11,11%	Hydrophile	0,139	0,296
N18	0,107	-	88,12%	Hydrophobe	0,151	0,446
F3	0,462	++	26,83%	MH	0,145	0,461
F8	0,580	++	66,14%	Hydrophobe	0,126	0,382
F29	0,132	+/-	39,00%	MH	0,162	0,290
M4	0,480	++	43,74%	Hydrophobe	0,150	0,244
M30	0,456	++	24,69%	MH	0,204	0,499

- : non formatrice de biofilm, +/- : faiblement formatrice de biofilm, + : modérément formatrice de biofilm, ++ : fortement formatrice de biofilm.

## **Conclusion et perspectives:**

La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *Staphylococcus* spp. La formation de biofilms sur les surfaces que ça soit en contact avec les aliments qui constituera un risque accru de contamination du produit, ou que ça soit sur les surfaces abiotique tel que les dispositifs médicale qu'ils soit chirurgicale ou implantable, puisque les bactéries au sein du biofilm sont plus résistantes aux désinfectants, antibiotique et à d'autres stress environnementaux, et cela peut conduire à des problèmes d'hygiène alimentaire, ou lors du traitement du patient.

Cette étude a permis de déterminer le potentiel de formation du biofilm par les Staphylocoques sur différents types de surface abiotique (microplaque et inox) avec l'exploration de l'effet du NaCl sur la formation du biofilm, et de déterminer la relation entre l'hydrophobicité et le potentiel à former du biofilm, ceci a été déterminé par l'exploitation des techniques quantitatives de RCA TCP MATH et culture sur inox.

Nos résultats montrent que la plus grande partie des souches d'origine confondues sont formatrices de biofilm (56,00% sur rouge Congo et 88,70% sur TCP). Les résultats obtenus montrent aussi que la présence de haute concentration de NaCl contribue à une augmentation considérable du taux du biofilm formé 71,42%.

En ce qui concerne l'hydrophobicité et la formation du biofilm sur les surfaces d'inox, les résultats obtenus (de la méthode de MATH et culture sur inox) montrent que l'hydrophobicité de la surface a un effet sur la formation du biofilm sur les surfaces abiotiques (toutes les souches hydrophiles avaient un taux élevé de biofilm formé).

En prenant en considération les résultats obtenus, on a remarqué que le taux de biofilm obtenu par la technique de microplaque n'est pas vraiment précis car sa précision pourrait être que la technique de quantification au Crystal violet ne différencie pas entre les cellules mortes et celles formatrices du biofilm, donc il serait intéressant d'entamer des études plus approfondies pour arriver à une technique de mesure plus précise.

On recommande aussi d'élargir cette étude pour le but de savoir l'effet d'autres paramètres (tel que le pH, la température) sur la formation du biofilm par les Staphylocoques. Nous recommandons aussi de tester d'autres surfaces comme le verre, la résine et le polypropylène.

## References bibliographique :

### A

- Achek, R., Hotzel, H., Cantekin, Z., Nabi, I., Hamdi, T.M., Neubauer, H., El-Adawy, H., 2018. Emerging of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. *BMC research notes*11, 663.
- Agarwal, A., Jain, A., 2013. Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. *The Indian journal of medical research*138, 262.
- Al Alam, D., 2008. Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales bronchiques et staphylococcus aureus sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Reims,
- Alomar, J., 2007. Étude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Institut National Polytechnique de Lorraine,
- Alcaráz, L.E., Satorres, S.E., Lucero, R.M., Centorbi, O.N., 2003. Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Brazilian Journal of Microbiology*34, 45-51.
- Ananthanarayan, R., 2006. Ananthanarayan and Paniker's textbook of microbiology. Orient Blackswan.
- Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2001a. Presence of icaA and icaD Genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of clinical microbiology*39, 2151-2156.
- Arciola, C.R., Collamati, S., Donati, E., Montanaro, L., 2001b. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagnostic Molecular Pathology*10, 130-137.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Baldassarri, L., Donati, M.E., Pirini, V., Gamberini, S., Montanaro, L., 2006. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of ica genes with two classic phenotypic methods. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*76, 425-430.

Avril, J.-L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., 2000. Bactériologie clinique. Ellipses Edition Marketing SA.

## **B**

Bailey, C.J., Lockhart, B.P., Redpath, M.B., Smith, T.P., 1995. The epidermolytic (exfoliative) toxins of *Staphylococcus aureus*. *Medical microbiology and immunology*184, 53-61.

Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., Kodjikian, L., 2010. Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal Français d'Ophtalmologie*33, 210-221.

Baird-Parker, A., 1965. Staphylococci and their classification. *Annals of the New York Academy of Sciences*128, 4-25.

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International journal of food microbiology*61, 1-10.

Bannerman, T.L., 2007. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci. Manual of clinical microbiology*, 390-411.

Ban, G.-H., Yoon, H., Kang, D.-H., 2014. A comparison of saturated steam and superheated steam for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. *Food Control*40, 344-350.

Bonsaglia, E., Silva, N., Júnior, A.F., Júnior, J.A., Tsunemi, M., Rall, V., 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*35, 386-391.

Branger, A., 2007. *Microbiochimie et alimentation*. Educagri Editions.

Bayer, M.G., Heinrichs, J.H., Cheung, A.L., 1996. The molecular architecture of the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*178, 4563-4570.

Berche, P., Gaillard, J.-L., Simonet, M., Simonet, M., 1988. *Bactériologie: bactéries des infections humaines*. Flammarion médecine-sciences.

Bergon, L., 2016. *S. capitis, S. caprae et S. lugdunensis: rôle dans les infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques*. Université Toulouse III paul SABATIER faculté des sciences pharmaceutiques.,

Biedenbach, D.J., Jones, R.N., 2009. Multicenter evaluation of the in vitro activity of dalbavancin tested against staphylococci and streptococci in 5 European countries:

- results from the DECIDE Surveillance Program (2007). *Diagnostic microbiology and infectious disease*64, 177-184.
- Bisognano, C., 2001. Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de " *Staphylococcus aureus*": étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. University of Geneva,
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E., 2004. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*97, 271-284.
- Boles, B.R., Horswill, A.R., 2011a. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in microbiology*19, 449-455.
- Boles, B.R., Horswill, A.R., 2011b. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol*19, 449-455.
- Bourgeois, C., Mescle, J., Zucca, J., 1996. *Microbiologie alimentaire: tome 1-Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. tome 2-Aliments fermentés et fermentations alimentaires.* Tec & Doc Lavoisier.
- Boutaleb, N., 2007. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Lorient,
- Brady, R.A., Graeme, A., Leid, J.G., Prior, M.L., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E., 2011. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infection and immunity*79, 1797-1803.

## C

- Campoccia, D., Montanaro, L., Speziale, P., Arciola, C.R., 2010. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*31, 6363-6377.
- Cappello, S., Guglielmino, S.P., 2006. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Brazilian Journal of Microbiology*37, 205-207.
- Casey, A., Lambert, P., Elliott, T., 2007. Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*29, S23-S32.
- CCR de Carvalho, C., 2012. Biofilms: new ideas for an old problem. *Recent patents on biotechnology*6, 13-22.
- Chaieb, K., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2005. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*

- isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infection*61, 225-230.
- Chevalier, C., 2009. Fonctions et mécanismes d'action de l'ARNIII et de nouveaux ARN non codants de *Staphylococcus aureus*. Strasbourg,
- Chiang, Y.-C., Pai, W.-Y., Chen, C.-Y., Tsen, H.-Y., 2008. Use of primers based on the heat shock protein genes hsp70, hsp40, and hsp10, for the detection of bovine mastitis pathogens *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus bovis*. *Molecular and cellular probes*22, 262-266.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H., 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity*37, 318-326.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*22, 996-1006.
- Ciftci, A., Findik, A., Onuk, E.E., Savasan, S., 2009. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*40, 254-261.
- Clutterbuck, A., Woods, E., Knottenbelt, D., Clegg, P., Cochrane, C., Percival, S., 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*121, 1-17.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., O'Gara, J.P., 2002. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS microbiology letters*216, 171-177.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*49, 711-745.
- Couderc, C., Jolivet, S., Thiébaud, A., Ligier, C., Remy, L., Alvarez, A., Lawrence, C., Salomon, J., Herrmann, J., Guillemot, D., 2014. Antibiotic Use and *Staphylococcus aureus* Resistant to Antibiotics (ASAR) Study Group. Fluoroquinolone use is a risk factor for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition in long-term care facilities: a nested case-case-control study. *Clin Infect Dis*59, 206.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Götz, F., 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and immunity*67, 5427-5433.

- Csonka, L., Epstein, W. 1996. Osmoregulation, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Washington DC: ASM Press).
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., Penadés, J.R., 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*183, 2888-2896.
- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, Í., Penadés, J.R., 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*72, 2177-2185.

## D

- Davido, B., 2010. Étude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré [thèse]. Paris: Université Diderot.
- Deighton, M.A., Capstick, J., Domalewski, E., Van Nguyen, T. 2001. [17] Methods for studying biofilms produced by *staphylococcus epidermidis*, In: *Methods in enzymology*. Elsevier, 177-195.
- Delarras, C., 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Denis, F., Ploy, M.-C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R., 2011. *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. Elsevier Health Sciences.
- DESCOTEAUX, L. 2004. La mammite clinique: stratégies d'intervention. In: *Symposium sur les bovins laitiers*.
- Di Bonaventura, G., Stepanović, S., Picciani, C., Pompilio, A., Piccolomini, R., 2007. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia microbiologica*52, 86.
- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*50, 930-936.
- Di Poto, A., Sbarra, M.S., Provenza, G., Visai, L., Speciale, P., 2009. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*30, 3158-3166.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L., 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*68, 2950-2958.

- Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J.K.-M., Horstkotte, M.A., Mack, D., 2003. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *Journal of bacteriology*185, 2879-2886.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*8, 881.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*15, 167-193.

## **E**

- Ebright, J.R., Penugonda, N., Brown, W., 2004. Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia: a retrospective analysis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*48, 17-21.
- El-Mahallawy, H.A., Loutfy, S.A., El-Wakil, M., El-Al, A.K.A., Morcos, H., 2009. Clinical implications of icaA and icaD genes in coagulase negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* bacteremia in febrile neutropenic pediatric cancer patients. *Pediatric blood & cancer*52, 824-828.
- Eveillard, M., 2007. Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission: adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Université d'Angers,

## **F**

- Fasquelle, R., 1974. *Eléments de bactériologie médicale*. Flammarion.
- Freeman, D., Falkiner, F., Keane, C., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*42, 872-874.
- Fomba, 2006. *Role pathogène et sensibilité aux antibiotique des acinitobacter baumani et staphylocoque à coagulase négative a l'hopitale du point G thèse de doctorat :Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie*. 95.
- Foster, T.J., Höök, M., 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*6, 484-488.
- Frank, J.F., 2001. *Microbial attachment to food and food contact surfaces*.
- Freney, J., Brun, Y., Bes, M., Meugnier, H., Grimont, F., Grimont, P.A., Nervi, C., Fleurette, J., 1988. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov.,

two species from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*38, 168-172.

Freney, J., Kloos, W., Hajek, V., Webster, J., Bes, M., Brun, Y., Vernozy-Rozand, C., 1999. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*49, 489-502.

Fusillo, M.H., Weiss, D.L., 1959. Qualitative estimation of staphylococcal deoxyribonuclease. *Journal of bacteriology*78, 520.

## G

Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z., 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*18, 1049-1056.

Gillespie, S., Hawkey, P.M., 2006. Principles and practice of clinical bacteriology. John Wiley & Sons.

Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., Jacques, M., 2016. Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière: une revue bibliographique.

Götz, F., 2002. Staphylococcus and biofilms. *Molecular microbiology*43, 1367-1378.

Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.-H., 2006. The genera staphylococcus and macrococcus. *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 5-75.

Gras, D., 2006. Etude des interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines normales et mucoviscidose et Staphylococcus Aureus. Reims,

Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F., Peschel, A., 2001. Key role of teichoic acid net charge instaphylococcus aureus colonization of artificial surfaces. *Infection and immunity*69, 3423-3426.

Grünfeld, J.-P., 1994. Dictionnaire de médecine Flammarion. Médecine-Sciences.

## H

Hájek, V., Meugnier, H., Bes, M., Brun, Y., Fiedler, F., Chmela, Z., Lasne, Y., Fleurette, J., Freney, J., 1996. Staphylococcus saprophyticus subsp. bovis subsp. nov., isolated from bovine nostrils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*46, 792-796.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Høiby, N., Moser, C., William Costerton, J., Moter, A., Bjarnsholt, T., 2012. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*65, 127-145.

- Hanzen, C., 2009. Propédeutique de la glande mammaire, sémiologie et diagnostic individuel et de troupeau. Liège, Belgique, Université de Liège, 5-28.
- Harjai, K., Khandwaha, R., Mittal, R., Yadav, V., Gupta, V., Sharma, S., 2005. Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia microbiologica* 50, 99-102.
- Harraghy, N., Seiler, S., Jacobs, K., Hannig, M., Menger, M.D., Herrmann, M., 2006. Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *The International journal of artificial organs* 29, 368-378.
- Hawkey, P.M., 2006. *Proteus, providencia and Morganella spp. Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 391-396.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular microbiology* 20, 1083-1091.
- Hennekinne, J., 2009. Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive. Thèse Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. 183p.
- Henry-Stanley, M.J., Shepherd, M.M., Wells, C.L., Hess, D.J., 2011. Role of *Staphylococcus aureus* protein A in adherence to silastic catheters. *Journal of Surgical Research* 167, 9-13.
- Homkong, P., Bender, J.B., Chutipongvivate, P., Punyapornwithaya, V., Yano, T., Kreausukon, K., 2017. Detection of multi-drug resistant bacterial recovered in a community animal control setting. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 12, 109-114.
- Hostacka, A., Ciznar, I., 2007. Biofilm formation and response to oxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* non-O1 depending on culture media. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne* 56, 186-190.

## I

- Irlinger, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International journal of food microbiology* 126, 302-310.

## J

- Jain, A., Agarwal, A., 2009. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of microbiological methods*76, 88-92.
- Jana, T., Srivastava, A., Csery, K., Arora, D., 1999. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Canadian journal of microbiology*46, 28-37.
- Jidar, 2007. Prévalence du staphylocoque doré résistant à la méthicilline chez les patients hospitalisé en dermatologie . thèse de doctorat : université Paris Descart faculté de médecine 55.
- Jo, S.-H., Baek, S.-B., Ha, J.-H., Ha, S.-D., 2010. Maturation and survival of *Cronobacter* biofilms on silicone, polycarbonate, and stainless steel after UV light and ethanol immersion treatments. *Journal of food protection*73, 952-956.

## **K**

- Kara Terki, I., 2014. Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen.
- Karam, O.L., 2005. Sepsis à " staphylocoque epidermidis" chez les grands prématurés: situation à Genève, entre 1995 et 2002. University of Geneva,
- Kelly, D., McAuliffe, O., Ross, R., Coffey, A., 2012. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Letters in applied microbiology*54, 286-291.
- Kiedrowski, M.R., Horswill, A.R., 2011. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*1241, 104-121.
- Klein, E., Smith, D.L., Laxminarayan, R., 2007. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging infectious diseases*13, 1840.
- Kluytmans, J., Van Belkum, A., Verbrugh, H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*10, 505-520.
- Knobloch, J.K.-M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.-H., Mack, D., 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of bacteriology*183, 2624-2633.

- Knobloch, J.K.-M., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Mack, D., 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical microbiology and immunology*191, 101-106.
- Kodjikian, L., Roques, C., Campanac, C., Doleans, A., Baillif, S., Pellon, G., Renaud, F., Hartmann, D., Freney, J., Burillon, C., 2005. Biofilms à *Staphylococcus epidermidis* à la surface des implants intraoculaires. *Journal français d'ophtalmologie*28, 224-230.
- Koksal, F., Yasar, H., Samasti, M., 2009. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiological research*164, 404-410.
- KRIDECH, H., BEN BLIDIA, A., 2016. Isolement et caractérisation des staphylocoques responsables des infections urinaires.
- Krieg, N.R., Manual, H., 1984. *Systematic Bacteriology*. Williams Baltimore.
- Krukowski, H., Szymankiewicz, M., Lisowski, A., 2008. Slime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Pol J Microbiol*57, 253-255.

## L

- Lasa, I., Penadés, J.R., 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*157, 99-107.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*2, 63-76.
- Le Minor, L., Veron, M., 1990. *Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus»* J. Fleurette2, 773-794.
- Lee, J.S., Bae, Y.M., Lee, S.Y., Lee, S.Y., 2015. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer. *Journal of food science*80, M2279-M2286.
- Lee, S., Choi, K.-H., Yoon, Y., 2014. Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* outbreak linked to ham. *Korean journal for food science of animal resources*34, 257.
- Leyral, G., Vierling, E., 2007. *Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires*, 4eme éditions EditionFrance, 287 p.
- Liang, X., Zheng, L., Landwehr, C., Lunsford, D., Holmes, D., Ji, Y., 2005. Global regulation of gene expression by ArlRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*187, 5486-5492.

- Liesse Iyamba, J.-M., 2012. Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T.T., Lee, C.Y., 2004. Control of glucose-and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*186, 722-729.
- Lister, J.L., Horswill, A.R., 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*4, 178.
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R., 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*2, a000398.

## M

- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R., 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of bacteriology*178, 175-183.
- Mack, D., Bartscht, K., Fischer, C., Rohde, H., de Grahl, C., Dobinsky, S., Horstkotte, M.A., Kiel, K., Knobloch, J.K.-M. 2001. [20] Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation, In: *Methods in enzymology*. Elsevier, 215-239.
- Mamo, W., Rozgonyi, F., Brown, A., Hjertean, S., Wadstrom, T., 1987. Cell surface hydrophobicity and charge of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Journal of applied bacteriology*62, 241-249.
- Manna, A.C., Bayer, M.G., Cheung, A.L., 1998. Transcriptional analysis of different promoters in the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*180, 3828-3836.
- Martín-López, J.V., Pérez-Roth, E., Claverie-Martín, F., Gil, O.D., Batista, N., Morales, M., Méndez-Álvarez, S., 2002. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the ica gene cluster needed for biofilm establishment. *Journal of clinical microbiology*40, 1569-1570.
- Martinez, L.R., Casadevall, A., 2007. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*73, 4592-4601.

- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., Fatma, T., Rattan, A., 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*24, 25.
- Melo, P.d.C., Ferreira, L.M., Nader Filho, A., Zafalon, L.F., Vicente, H.I.G., Souza, V.d., 2013. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*44, 119-124.
- Merghni, A., Nejma, M.B., Helali, I., Hentati, H., Bongiovanni, A., Lafont, F., Aouni, M., Mastouri, M., 2015. Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial pathogenesis*86, 1-9.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*10, 39.
- Mittelman, M.W., 1996. Adhesion to biomaterials. *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity*. New York: Wiley-Liss, Inc, 89-127.
- Morad Asaad, A., Ansar Qureshi, M., Mujeeb Hasan, S., 2016. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolates from nosocomial bloodstream infections. *Infectious Diseases*48, 356-360.
- Morea, M., Baruzzi, F., Cocconcelli, P., 1999. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology*87, 574-582.
- Morot-Bizot, S.C., 2006. les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II,
- Mounier, M., Pestourie, N., Ploy, M.-C., Denis, F., 2009. Les détergents et les désinfectants: les risques liés à l'usage médical des biocides (2e partie). *Antibiotiques*11, 234-242.
- Musk, D.J., Banko, D.A., Hergenrother, P.J., 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & biology*12, 789-796.

## N

- NAGASE, N., SHIMIZU, A., KAWANO, J., YAMASHITA, K., YOSHIMURA, H., ISHIMARU, M., KOJIMA, A., 2002. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. *Journal of veterinary medical science*64, 1169-1172.

Nasr, R.A., AbuShady, H.M., Hussein, H.S., 2012. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian journal of medical human genetics*13, 269-274.

Nauciel, C., Vildé, J.-L., 2005. *Bactériologie médicale*. Elsevier Masson.

Neopane, P., Nepal, H.P., Shrestha, R., Uehara, O., Abiko, Y., 2018. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International journal of general medicine*11, 25.

Nouwen, J.L., Van Belkum, A., Verbrugh, H.A., 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Netherlands journal of medicine*59, 126-133.

## O

Oli, M., Otoo, H., Crowley, P., Heim, K., Nascimento, M., Ramsook, C., Lipke, P., Brady, L., 2012. Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*158, 2903.

Otto, M., 2004. Quorum-sensing control in *Staphylococci*—a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS microbiology letters*241, 135-141.

Otto, M. 2008. *Staphylococcal biofilms*, In: *Bacterial biofilms*. Springer, 207-228.

Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature reviews microbiology*7, 555.

Oubekka, S.D., 2012. Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus*: apport de la microscopie de fluorescence multimodale. Université Paris Sud-Paris XI,

## P

Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Höök, M., 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Reviews in Microbiology*48, 585-617.

Peng, J.-S., Tsai, W.-C., Chou, C.-C., 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*65, 105-111.

Peters, G., Locci, R., Pulverer, G., 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *Journal of Infectious Diseases*146, 479-482.

Piette, A., Verschraegen, G., 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary microbiology*134, 45-54.

Planchon, S., 2006. Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms. Etude d'une souche " biofilm-positif" par une approche protéomique. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II,

Pratten, J., Foster, S.J., Chan, P.F., Wilson, M., Nair, S.P., 2001. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes and infection*3, 633-637.

## Q

Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S., Fitzpatrick, E.i., 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons.

## R

Raad, I., Hanna, H., Jiang, Y., Dvorak, T., Reitzel, R., Chaiban, G., Sherertz, R., Hachem, R., 2007. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy*51, 1656-1660.

Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M., Ziebuhr, W., 2000. Alternative Transcription Factor  $\zeta$ B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate. *Journal of bacteriology*182, 6824-6826.

Rémy, D., 2010. *Les mammites*. France AgricoleÉditions.

Rode, T.M., Langsrud, S., Holck, A., Møretrø, T., 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*116, 372-383.

Rosenberg, M., 1981. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.*42, 375-377.

Rosenberg, M., 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS microbiology letters*262, 129-134.

Ruhe, J., Menon, A., Mushatt, D., DeJace, P., Hasbun, R., 2004. Non-epidermidis coagulase-negative staphylococcal bacteremia: clinical predictors of true bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*23, 495-498.

## S

Saitou, K., Furuhashi, K., Kawakami, Y., Fukuyama, M., 2009. Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol science*14, 65-68.

- Sambanthamoorthy, K., 2007. Role of Msa in the Regulation of Virulence and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*.
- Satorres, S.E., Alcaráz, L.E., 2007. Prevalence of icaA and icaD genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Central european journal of public health*15.
- Seegers, H., Sérieys, F., 2002. Intervention du vétérinaire face à un problème de mammites. 1-Questions de base et réponses possibles aujourd'hui. Journées Nationales GTV. Tours, 139-145.
- Shah, C.B., Mittelman, M.W., Costerton, J.W., Parenteau, S., Pelak, M., Arsenault, R., Mermel, L.A., 2002. Antimicrobial activity of a novel catheter lock solution. *Antimicrobial agents and chemotherapy*46, 1674-1679.
- Shanks, R.M., Donegan, N.P., Graber, M.L., Buckingham, S.E., Zegans, M.E., Cheung, A.L., O'Toole, G.A., 2005. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infection and immunity*73, 4596-4606.
- Shanks, R.M., Sargent, J.L., Martinez, R.M., Graber, M.L., O'Toole, G.A., 2006. Catheter lock solutions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic surfaces. *Nephrology Dialysis Transplantation*21, 2247-2255.
- Shenkman, B., Rubinstein, E., Cheung, A.L., Brill, G.E., Dardik, R., Tamarin, I., Savion, N., Varon, D., 2001. Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: roles of agrand sar loci, platelets, and plasma ligands. *Infection and immunity*69, 4473-4478.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., Sharma, M., 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of antimicrobial chemotherapy*65, 1955-1958.
- Snoussi, M., Noumi, E., Cheriaa, J., Usai, D., Sechi, L.A., Zanetti, S., Bakhrouf, A., 2008. Adhesive properties of environmental *Vibrio alginolyticus* strains to biotic and abiotic surfaces. *New Microbiol*31, 489-500.
- Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A., Failing, K., 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary microbiology*96, 91-102.
- Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., Carli, E., Lui, A., Maniglio, D., Brugnara, M., 2004. Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*25, 2029-2037.

Spicer, W. 2003. *Pratique clinique en bactériologie mycologie et parasitologie* Flammarion Médecine-Sciences (Paris).

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*40, 175-179.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., BONAVENTURA, G.D., Djukić, S., Čirković, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*115, 891-899.

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

## T

Taj, Y., Essa, F., Aziz, F., Kazmi, S.U., 2012. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infection in Developing Countries*6, 403-409.

Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Débarbouillé, M., Penadés, J.R., Lasa, I., 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *Journal of bacteriology*187, 5318-5329.

Touati, A., Achour, W., Abbassi, M.-S., Hassen, A.B., 2007. Détection des gènes *ica* et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques. *Pathologie Biologie*55, 277-282.

Trotonda, M.P., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., Penadés, J.R., 2005. SarA positively controls *bap*-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*187, 5790-5798.

Trouillet, S., 2011. *Physiopathologie des infections ostéo-articulaires à Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis*.

## V

Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*109, 1117-1131.

VandenBergh, M.F., Yzerman, E.P., van Belkum, A., Boelens, H.A., Sijmons, M., Verbrugh, H.A., 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *Journal of clinical microbiology*37, 3133-3140.

Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*92, 179-185.

Vautor, E., Abadie, G., Pont, A., Thiery, R., 2008. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Veterinary microbiology*127, 407-411.

Von Eiff, C., Jansen, B., Kohnen, W., Becker, K., 2005. Infections associated with medical devices. *Drugs*65, 179-214.

Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., Otto, M., 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *Journal of Biological Chemistry*279, 54881-54886.

## W

Wallemacq, H., Girard, B., Lekeux, P., Bureau, F. 2010. La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. In: *Annales de Médecine Vétérinaire*, 16-29.

Weckman, B.G., Catlin, B.W., 1957. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *Journal of bacteriology*73, 747.

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances?, In: *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, 1-19.

Wylie, J.L., Nowicki, D.L., 2005. Molecular epidemiology of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *Journal of clinical microbiology*43, 2830-2836.

## X

Xu, H., Zou, Y., Lee, H.Y., Ahn, J., 2010. Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. *Journal of food science*75, M580-M585.

## Y

Yarwood, J.M., Schlievert, P.M., 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of clinical investigation*112, 1620-1625.

Yoon, H., Park, B.-Y., Oh, M.-H., Choi, K.-H., Yoon, Y., 2013. Effect of NaCl on heat resistance, antibiotic susceptibility, and Caco-2 cell invasion of *Salmonella*. *BioMed research international*2013.

## Z

- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Löbner, I., Götz, F., Hacker, J., 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular microbiology*32, 345-356.
- Zmantar, T., Chaieb, K., Makni, H., Miladi, H., Abdallah, F.B., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2008. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *Journal of basic microbiology*48, 308-314

## Annexes I :

### Matériel

- Anse de platine.
- Pipette pasteur.
- Boîtes de pétri.
- Tubes à essais.
- Tubes à hémolyse.
- Les microplaques en polystyrène.
- Etuve.
- Bec bunsen.
- L'hôte bactériologique.
- L'hôte chimique.
- Vortex.
- Spectrophotomètre.
- Lecteur ELISA.
- Les lames d'acier inoxydable.

### Milieux de culture

#### Milieux de culture liquides

##### Bouillon nutritif

Peptone .....	15,0 g
Extrait de levure .....	3,0 g
Chlorure de sodium .....	6,0 g
D(-) glucose.....	1,0g
Eau distillée .....	1000ml

pH = 7,2 ± 0,2.

##### Bouillon tryptone soja (TSB)

Tryptone.....	17,0 g
Peptone papainique de soja .....	3,0 g
Glucose .....	2,5g
Sels biliaries .....	1,5g
Chlorure de sodium .....	5,0g
Phosphate dipotassique.....	4,0g
Novobiocine.....	0,020g
Eau distillée .....	1000 ml

pH =7,4 ± 0,2

### Bouillon cœur-cerveille (BHIB)

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5.0g
Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0g
Phosphate disodique.....	2.0g
Chlorure de sodium.....	5.0g
Eau distillé.....	1000ml

pH= 7.4

### Milieux de culture solides

#### Gélose nutritive

Peptone.....	15g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	02g
Chlorure de sodium .....	05g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000ml

pH =6,8-7,4

#### Baird parker agar

Tryptone Bacto.....	10,0 g
Extrait de bœuf Bacto.....	5,0g
Extrait de levure Bacto.....	1,0 g
Chlorure de lithium .....	5,0 g
Glycine .....	12,0 g
Pyruvate de sodium .....	10,0 g
Tellurite de potassium .....	0,1 g
Gélose.....	20,0 g
Emulsion de jaune d'œuf .....	50,0mL

pH 6,8 ± 0,3

#### Gélose Chapman

Extrait de viande (bovin ou porcin) .....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovine et porcine) .....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

### Rouge Congo Agar

Eaux distillée.....	50g
Agar.....	37g
Rouge Congo.....	0.8g
BHIB.....	10g
Saccharose.....	1000ml

pH 6,8-7,4

### Réactifs :

- Hexadecane
- Ethanol
- NaOH
- HNO<sub>3</sub>
- Acetone

### Tampon Phosphate buffered saline.(PBS)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	240mg
NaCl.....	200mg
KCl.....	8g

pH 7.5 ±0.3

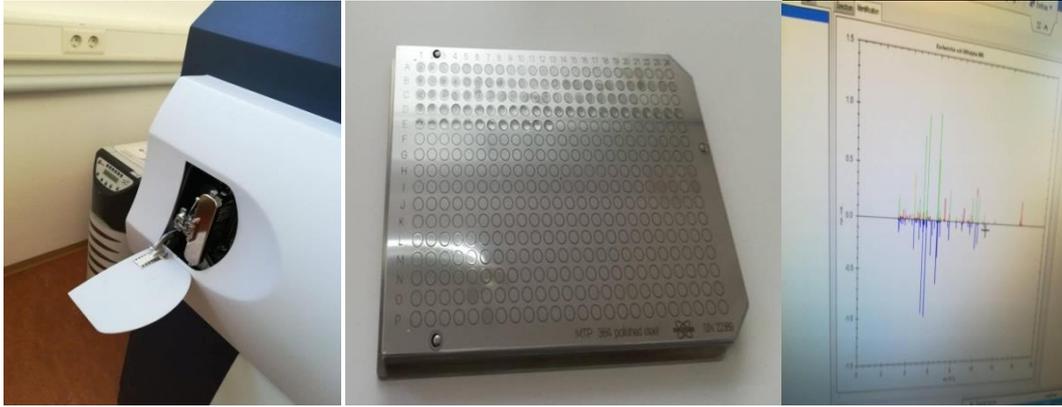
## Anesxes II :

### - Identification de *S. aureus* par la technique MALDI-TOF:

Le principe général du MALDI-TOF-MS TOF (matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight) est simple : des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique se déplacent, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge ( $m/z$ ). La première étape consiste à mélanger l'échantillon à la matrice, l'évaporation des solvants conduisant à la cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Le mélange ainsi formé est déposé sur un support (plaque métallique).

Dans ce travail, l'identification des espèces des Staphylocoques par MALDI-TOF MS a été effectuée sur des colonies présentant une croissance typique de Staphylocoques sur gélose Baird-Parker et repiquées sur gélose au sang. Quelques colonies ont été mises en suspension dans 300  $\mu\text{l}$  d'eau distillée stérile. Après addition de 900  $\mu\text{l}$  d'éthanol (96%), l'identification des espèces a été effectuée selon un protocole décrit par **(El-Ashker et al., 2015)**.

Brièvement, Après centrifugation pendant 5 minutes à 10 000 rpm, le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans 50  $\mu\text{l}$  d'acide formique à 70% (vol / vol) (Sigma-Aldrich, Allemagne). Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  d'acétonitrile ont été ajoutés, mélangés et centrifugés pendant 5 minutes à 10 000 rpm. Le surnageant était transféré dans un nouveau tube, 1,5  $\mu\text{L}$  du surnageant a été spoté sur une plaque cible MTP 384 polieSteel TF (BrukerDaltonikGmbH, Brême, Allemagne), et séché à l'air. L'extrait séché a été recouvert de 2  $\mu\text{L}$  d'une solution saturée en acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique(Sigma-Aldrich ChemieGmbH) dans une solution de 50% d'acétonitrile et 2,5% d'acide trifluoroacétique (Sigma-Aldrich ChemieGmbH). Le produit est séché à l'air à température ambiante. Ensuite une lecture des spectres de masse a été faite par un capteur (BrukerDaltonikGmbH). L'analyse a été réalisée avec le logiciel Biotyper 3.1 (BrukerDaltonikGmbH).



Identification des *S.aureus* par A MALDI-TOF MS (Spectromètre de lecture, plaque cible MTP 384 polie Steel TF, spectre de lecture).

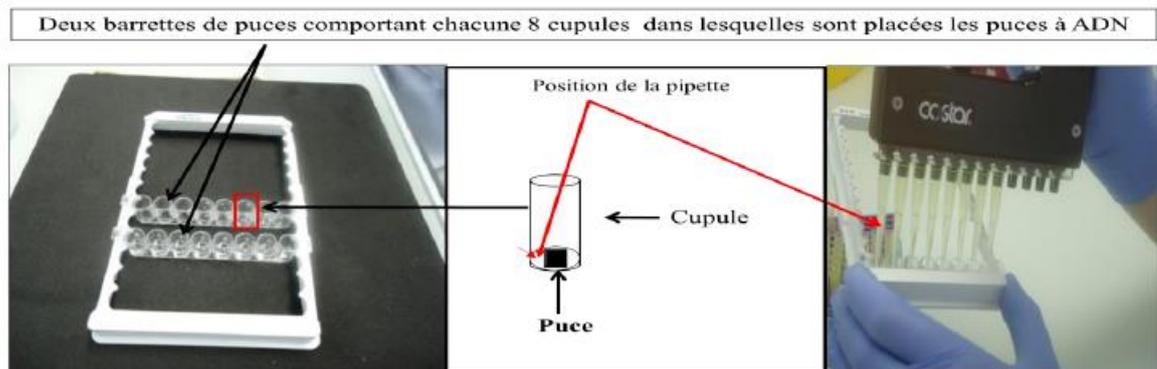
- **Détection des gènes de formation de biofilm par puces à ADN :**

Les gènes *icaA*, *icaC*, *icaD*, *bap* responsables de formation de biofilm par les Staphylocoques ont été recherché pour toutes souches isolées par technique de puces à ADN par le kit StaphyType (Alere, Technologies GmbH, Jena, Allemagne). La technologie des puces à ADN permet de recueillir des informations sur les supports génétiques de souches et permet également de mieux caractériser les facteurs de virulence et de les relier à un clone donné ou à une forme clinique observée. Les puces à ADN se présentent sous la forme de surfaces solides (lame de verre, membrane) de quelques millimètres carrés sur lesquelles sont disposées, sous forme de spots alignés et ordonnés, de courtes séquences cibles d'ADN simple brin, pouvant s'hybrider avec les produits PCR complémentaires.

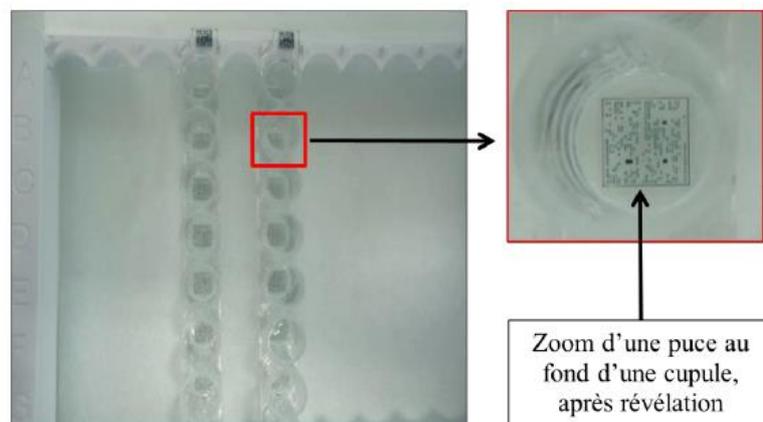
L'utilisation de la puce Alere repose sur l'amplification de 185 gènes qui codent pour : des marqueurs d'espèce, des marqueurs de résistance, des facteurs de virulence, des marqueurs de *SSCmec*, des capsules, des biofilms et autres marqueurs épidémiologiques permettant de rattacher les souches testées aux clones épidémiques et endémiques de *S. aureus*. Ces 185 gènes sont représentés par 332 allèles, ces derniers sont répartis sur la surface de la puce en 729 spots, chaque allèle (gène) est posé au minimum 2 fois (2 spots différents) ce qui permet de confronter les résultats obtenus et de les valider.

Après amplification et marquage de l'ADN, les fragments amplifiés sont mis en contact avec la puce pour permettre une ou des éventuelles hybridations amplifiat/cible. Ces hybridations seront ensuite révélées par une technique fluorescente ou chromogénique puis détectées à l'aide d'un lecteur dédié (ArrayMate®, Alere). Le protocole entier permet d'avoir

une cartographie génétique simplifiée de chaque souche testée en moins de 3 heures (Monecke et al., 2008) Brièvement, l'ADN génomique cible a été amplifié en mode linéaire et marqué à la biotine-16-dUTP .Les amplicons simple brin biotinylés ont ensuite été hybridés à la micropuce. Les étapes de lavage et de blocage ont été suivies conformément au protocole cité par(Monecke et al., 2008).Du conjugué peroxydase de raifort-streptavidine a été ajouté et, après incubation, la visualisation a été réalisée avec un substrat chromogène.



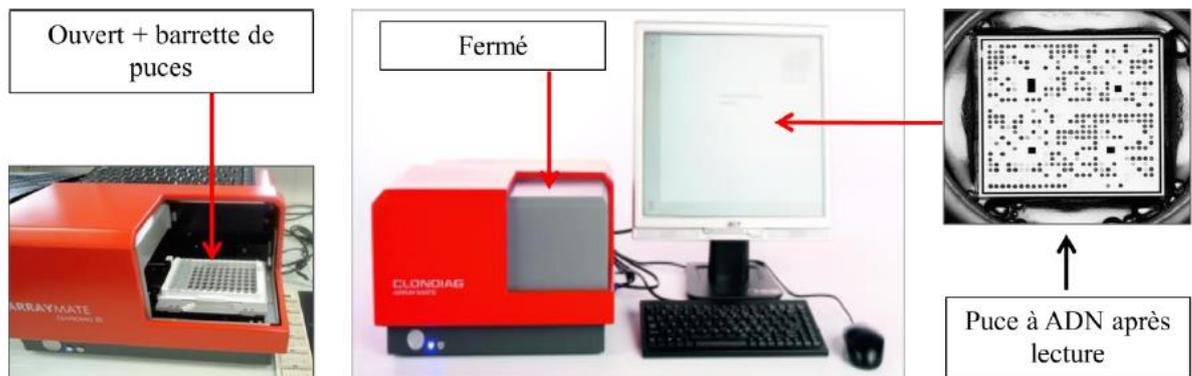
Technique de préparation des puces à ADN



Aspect des puces après l'étape de révélation.

La lecture des puces par l'automate, ARRAYMATE de la marque Clondiag® , La barrette de cupules est alors insérée dans le lecteur, l'automate par son logiciel affiche la photo de chaque puce. En sachant que l'emplacement de chaque spot correspond à un gène connu, la photo de la puce montre les différents spots colorés dans un dégradé de blanc à noir. Le blanc indiquant qu'il n'y a pas eu hybridation entre le gène et l'amorce, il sera donc

interprété comme absence du gène recherché, au contraire un spot noir sera interprété comme présence du gène recherché.



Lecture d'une puce ADN de *S. aureus* par l'automate Clondiag® - ARRAYMATE.