

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**

Présenté par : Encadré par : Dr. ACHEK R

- **MEKKI Hayat**
- **BEN KHADIDJA Faiza**
- **LARDJANE Nadjat**

Devant le jury :

M. CHEURFA M.
Mme DIDOUH N.

MCB
MCB

Président **UDB Khemis Miliana**
Examinatrice **UDB Khemis Miliana**

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Au terme de ce travail, on exprime notre remerciement à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

D'abord On tient à remercie notre encadreur monsieur RACHID ACHEK pour son soutien, sa disponibilité, ses encouragements, et sa confiance et même avec ses conseils toute au long de ce travail.

On tient à remercier aussi, les membres de jury :

-Mr CHEURFA .M président de jury.

-Mr ACHEK, R encadreur.

-Mme DIDOUH. A examinatrice

On tient notre remerciement à nos parents, qu'ils ont été toujours la source de soutien pour nous, leurs conseils, leurs encouragements c'étaient notre force.

On remercie également nos amies qui ont contribué à nous donner le courage pour finir ce mémoire, malgré les difficultés qu'on a trouvées

Un spécial remerciement à notre chère camarade MAROUA BELHENICHE qui nous a aidées beaucoup pendant ce travail, bien qu'elle a été aussi occupée,

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de nous rencontrer et de répondre à nos questions durant nos recherches.

DÉDICACE

JE DÉDIE CE TRAVAIL :

À MES TRÈS CHERS PARENTS, POUR LEUR SOUTIEN, LEUR ENCOURAGEMENT, LEUR AMOUR, ET LEURS SACRIFICE TOUT AU LONG DE MA VIE QUI PERSONNE NE PEUT LES COMPENSER .MA MÈRE, MON PÈRE, UN GRAND MERCI À VOUS.

QUE DIEU VOUS PROTÈGEZ ET VOUS ACCORDEZ SANTÉ ET LONGUE VIE.

À MES SŒURS : FATIMA, AMEL, AHLEM POUR LEURS DISPONIBILITÉS, LEURS ENCOURAGEMENTS.

À MES FRÈRES : MUSTAPHA ET BELAID QUE DIEU LES PROTÈGE.

À TOUS MA FAMILLE : ONCLES, TANTES, COUSINS ET COUSINES.

À TOUS MES AMIS SURTOUTS : MERIEM, ROMAÏSSA QUI M'ONT TOUJOURS DONNÉ DE L'ESPOIR ET CRU EN MES CAPACITÉS.

NADJET

JE DÉDIE CE MÉMOIRE

À MES TRES CHÈRES PARENTS, SOURCE DE TENDRESSE ET DE SACRIFICE POUR MOI, ILS ONT ÉTÉ TOUJOURS MA FORCE, LEURS PRIÈRES C'ÉTAIENT LA LUMIÈRE DANS MA VIE. MA MÈRE, MON PÈRE, VOUS RESTEREZ TOUJOURS LE TITRE D'AMOUR POUR MOI. UN GRAND MERCI.

À MES FRÈRES, MOHAMED, IBRAHIM, LOTFI ET AHMED, POUR TOUTE LE COURAGE QUE VOUS ME DONNEZ, ET POUR VOS DISPONIBILITÉS DURANT TOUT MA CARRIÈRE, JE VOUS DÉDIÉ CE TRAVAIL, QUE DIEU VOUS PROTÈGE INCHAAALLAH.

À TOUS MES COPINES, CEUX QUI M'ONT LAISSÉS AVOIR LE SENTIMENT D'ÊTRE ENTOURÉE AVEC DES SŒURS AGRÉABLES.LA LISTE EST LONG, MAIS JE DÉDIÉ CE TRAVAIL À CHACUNE D'ENTRE VOUS...MERCİ MES SŒURS.

FAIZA

JE DÉDIE CE MÉMOIRE À :

MES TRÈS CHERS PARENTS POUR LEUR SOUTIEN, LEUR ENCOURAGEMENT, ET AUSSI LEURS SACRIFICES TOUTE AU LONG DE MES ÉTUDES.

POUR MON MARI, QUI M'AIDE BEAUCOUP.

À MES SŒURS AMINA ET Ferial, ET LA PETIT DE NOTRE FAMILLE MON CHÈRE FRÈRE.

À TOUS MES AMIES, QUI SONT TOUJOURS LA CHOSE QUI M'À DONNÉ L'ESPOIR ET M'ENTOURÉ PAR L'AMOUR.

HAYET

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction	1
Chapitre I : Etude de genre staphylocoque	4
I. Historique	4
II. Définition	4
III. Habitat	4
IV. Taxonomie et classification	5
V. Espèces de staphylocoques	6
a. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
b. Autres espèces de staphylocoques	6
VI. Caractères morphologiques	8
VII. Caractères culturels	9
VIII. Caractères biochimiques	10
IX. Transmission	11
X. Pouvoir pathogène	11
X.1. Chez l'homme	11
X.1.1. Infections nosocomiales	11
X.1.2. Infections cutanéomuqueuses	12
X.1.3. Infections systémiques	12
X.1.3.1. Septicémies	12
X.1.3.2. Endocardites	14
X.1.4. Toxi-infections alimentaires	14
X.1.2. Chez l'animal	15
X.2.1. Mammite Staphylococcique	15
X.2.2. Staphylococcies aviaires	16

XI.Facteurs de virulence	17
XI.1. Toxines	18
XI.1.1. Toxines de syndrome de choc toxique (TSST).....	18
XII.1.2. Hémolysines	18
XII.1.3. Entérotoxines.....	19
XII.1.4. Les toxines épidermolytiques (ou exfoliatines).....	19
XII.1.5. Toxines pyrogènes.....	20
XII.2. Les MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule) :	20
XII.2.1. Protéine A.....	21
XII.2.2. Protéine EbpS	21
XII.2.3. La protéine Cna	22
XII.2.4. Les protéines ClfA et ClfB	22
Chapitre II : Les biofilms	24
I.Historique	24
II.Définition	25
III.1. Adhésion ou attachement :.....	26
a) Adhésion réversible.....	26
b) Adhésion irréversible	27
III.2. Maturation.....	27
III.3. Détachement	27
IV.Composition et architecture du biofilm	29
V.Quorum Sensing.....	30
VI.Facteurs impliqués dans la formation de biofilm chez les staphylocoques	31
VI.1. Facteurs impliqués dans l'adhésion initiale.....	31
VI.1.1. Interactions physicochimiques.....	31
VI.1.2. Acide téichoïques.....	32
VI.1.3. Adhésines	32
VI.1.3.1. Les autolysines/adhésines	32
VI.1.3.1. Les MSCRAMMs	33
VI.1.3.1. La protéine A	33

VI.2. Facteurs impliqués dans l'agrégation intercellulaire	33
VI.2.1L'adhésine polysaccharidique intercellulaire PIA)	33
a)Description du PIA.....	33
b) Biosynthèse de PIA	35
VI.2.2 Protéine Associée à l'Accumulation (AAP).....	36
VI.2.3 Protéine BAP	36
VI.2.4.Protéines SasG et Pls	37
VI.2.5. Alpha-toxine	37
VI.2.6. ADN extracellulaire.....	37
VII.Régulation génétique.....	38
VII.1.Système Accessory Gene Regulator (agr).....	38
VII.2. Système sar (Staphylococcal Accessory gene Regulator).....	39
VII.3. Facteur sigma B (SIGB) :.....	40
VII.4. Régulateur de la formation de biofilm (RBF)	40
VII.5. Système "Autolysis Related Locus " (ARL R/S).....	41
VII.6. Répresseur de l'adhésion intercellulaire IcaR	41
VII.7.. Autres régulateurs.....	41
VIII.Facteurs favorisant la formation du biofilm.....	42
a) Surface.....	42
b)Les caractéristiques du milieu.....	42
c)Propriété des cellules.....	43
VIII.Résistance bactérienne à divers agents antimicrobiens liés au biofilm	44
IX.Moyens de lutte contre les biofilms.....	44
X.Traitementdu biofilm Staphylococcique préformé :	45
Matériel et méthodes.....	47
I. Lieu d'étude	47
II. Origine des souches.....	47
III. Isolement et purification	47
IV. Identification.....	47
V. Détection des gènes icaABCD.....	47
VI.Revivation et vérification des souches.....	48

VII. Matériel utilisé	48
VII. 1. Matériel non biologique	48
VIII. Etude de la formation du Biofilm	49
VIII.1. Méthode de Rouge CongoAgar(RCA).....	49
VIII.2. Méthode de plaque de culture de tissu (TCP)	50
IX. Etude de l'effet de quelques facteurs sur la formation du biofilm	53
IX.1. Choix des souches :	53
IX.2. L'effet du pH	53
IX.3. L'effet de NaCl.....	54
IX.4. effet d'éthanol.....	54
IX.5. L'effet du H ₂ O ₂	54
X. Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne de <i>Staphylococcus sp</i> par la technique MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) :.....	54
XI. Evaluation de la capacité des souches à former le biofilm sur l'acier inoxydable	55
XII. Analyses statistiques.....	56
Conclusion	58
Références bibliographiques.....	60
Annexes.....	80

Liste des tableaux

Tableau 1: Différence espèces de genre staphylococcus (Garrity <i>et al</i> ,2002; Sterpan <i>et al</i> , 2004;Federighi ,2005).	08
Tableau 2 : les importants variable intervenant dans la fixation des cellules microbiennes et formation de biofilm (Donlan,2002).	44
Tableau 3: Classification de la formation de biofilm (Stepanovic <i>et al.</i> , 2007).	53

Liste des figures

Figure 1: Observation microscopique des Staphylocoques (Spicer, 2003)	09
Figure 2: Facteurs de virulence chez <i>Staphylococcus aureus</i> (Al Alam, 2008).	18
Figure 3 : Organisation structurale des protéines de surfaces de <i>S. aureus</i> (Jidar, 2007)	21
Figure 4 : micrographies par microscope électronique à structure du biofilm <i>S.aureus</i> . (kong <i>et al.</i> ;2018)	05
Figure 5 : Les principales étapes de la formation du biofilm (Lebeaux & Ghigo, 2012).	29
Figure 6: Composition du biofilm Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Götz <i>et al.</i> ,. 2002).	30
Figure 7: Structure de l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) (Mack <i>et al.</i> , 1996)	35
Figure 8: Biosynthèse de PIA chez <i>Staphylococcus</i> spp (Liesse Iyamba, 2012).	36
Figure 9 : Fonctionnement du système agr (Bronner <i>et al.</i> , 2004)	39
Figure 10: Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou <i>et al.</i> , 2012)	50
Figure 11: Formation de biofilm en microplaque (Bellifa,2014)	52

Liste des abréviations

AAP : Protéine Associée à l' Accumulation
ADN: acide désoxyribonucléique.
agr: accessory gene regulator.
arlRS: autolysis related locus.
ARN: *acide* ribonucléique
Bap : Biofilm Associated Protein.
BHIB : Brain –Heart Infusion Broth (Bouillon cœur cerveau).
C° : Degré Celsius.
CAMP : Christie, Atkins, Munch-Petersen (les découvreurs de Ce test).
Cif : 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.
Eap: extra -cellular adherenceprotein,
Erseau distillée stérile.
Efp: extra cellular fibrinogen binding protein.
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
EMP: extra cellular matrix binding protein.
EnBP A/B : protéine de liaison a la fibronectine A/B
EntB : Entérotoxines.
EPS : Exo polysaccharides.
ETDA : acide éthylène diamine tetraacetique.
g : Gramme.
g/l : Gramme par litre.
GN : Gélose nutritif
h : Heure.
HNO3 : Acide nitrique.
H₂O₂ : eau oxygénée
ica : inter cellular adhésion.
ISO : organisation internationale de normalisation.
Kda: kilo dalton
L: Litre.
min: Minute.
LPS : Lipopolysaccharides.
LytRS : lyse regulateur système.
ml: Millilitre.

mm: Millimètre.

MSCRAMM: Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix. Molecule.

MALDI-TOF-MS TOF: Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight.

MATH: Microbial Adhesion to Hydrocarbon.

NaCl : Chlorure de sodium.

Nm : nanomètre.

ORF: Open Reading Frame.

P1/2/3: promoteur 1/2/3.

PBS: Phosphate buffered saline.

pH: Potentiel hydrogéné.

PIA: Polysaccharide intercellular adhesion.

Pls: Plasmine sensitive surface protein.

QS: Quorum Sensing.

Rbf: regulator biofilm formation.

RCA : Rouge Congo Agar.

SA : *Staphylococcus aureus*.

SaeRS : *S. aureus* exoprotein expression

Sar : staphylococcal accessory regulator.

SasG : *S. aureus* surface protein G.

Sdr ou SD : repeats répétitions Sérine-Asparagine.

SCV: small colony variants.

SigB: sigma B

Srr : Staphylococcal respiratory response.

TCP : méthode de plaque de culture de tissu.

TetR : Tétracycline Réglable.

TSB : Bouillon Tryptone Soja.

TSST : Toxines de syndrome de choc toxique.

V/V : Volume par volume.

RESUME :

Les Staphylocoques sont des bactéries pathogènes de grande importance dans les infections liées au corps étrangère. Leur capacité à former des biofilms est un déterminant important de la virulence et la pathogénicité de ces bactéries. L'objectif principal de cette étude est de mettre en évidence la capacité des souches de Staphylocoques à former un biofilm ainsi que d'évaluer l'effet de quelques facteurs sur le potentiel de formation de biofilm sur des surfaces abiotiques. L'étude est réalisée avec des souches de staphylocoques (*S. aureus* et staphylocoques à coagulase négative) isolées des infections humaines et animales. Les souches ont été identifiées selon des protocoles d'identification classiques et confirmées par la technique de MALDI-TOF MS. Les gènes responsables de formation de biofilm (*icaA* ; *icaC* ; *icaD* ; *bap*) ont été recherchés par PCR et par technique de puces à ADN (Microarray). Les deux techniques : plaque de culture de tissus (TCP), et méthode de rouge Congo agar (RCA), ont été utilisées pour l'étude de formation de biofilm en évaluant aussi l'effet de concentration de NaCl, de pH, de H₂O₂, de l'éthanol ainsi que l'hydrophobicité des souches. A part la revivification et la vérification de souches conservées, aucun résultat relatif au potentiel de formation de biofilm n'a pas été obtenu à cause de la crise sanitaire COVID-19.

Mots clés: Staphylocoques, biofilm, gènes *icaADBC*, TCP, RCA.

Abstract:

Staphylococci are pathogenic bacteria of great importance in infections caused by microorganisms. Their ability to form biofilms is an important determinant of the virulence and pathogenicity of these bacteria. The aim of this study is to investigate the ability of *Staphylococcus* strains to form a biofilm and to assess the effect of some factors on the potential for biofilm formation on abiotic surfaces. The study is performed using isolates of staphylococci (*S. aureus* and coagulase negative staphylococci) isolated from human and animal samples. The isolates were identified according to standard identification protocols and confirmed by the MALDI-TOF MS technique. The genes responsible for biofilm formation (*icaA*; *icaC*; *icaD*; *bap*) were detected by PCR and by DNA microarray technique (Microarray). The two techniques: tissue culture plate (TCP), and Congo red agar method (RCA), were used for the study the biofilm formation and for evaluating the effect of NaCl concentration, pH, H₂O₂, ethanol and the hydrophobicity of the isolates. Even that the revivification and verification of conserved isolates, no results relating to the potential for biofilm formation have not been obtained due to the COVID-19 pandemic.

Keywords: Staphylococci, biofilm, genes *icaADBC*, TCP, RCA.

المخلص

تعتبر المكورات العنقودية من اهم العوامل الممرضة في العدوى المرتبطة بالأجسام الغريبة. تعد قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية عاملاً هاماً في تحديد قابلية هذه البكتيريا للأمراض. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو إثبات قدرة سلالات المكورات العنقودية على تكوين غشاء حيوي وكذلك تقييم تأثير بعض العوامل على إمكانية تكوين الأغشية الحيوية على الأسطح غير الحية. أجريت الدراسة على سلالات من المكورات العنقودية (المكورات العنقودية الذهبية والمكورات العنقودية غير المخثرة "فحص التخثير سلبي) المعزولة من العدوى البشرية والحيوانية. تم تحديد السلالات وفقاً لبروتوكولات التعريف الكلاسيكية وتم تأكيدها بواسطة تقنية MALDI-TOF MS. تم البحث عن الجينات المسؤولة عن تكوين الأغشية الحيوية (icaA؛ icaC؛ icaD؛ icaB) بواسطة PCR وتقنية شريحة الحمض النووي (DNA Microarray). تم استخدام الطريقتين: لوحة زراعة الأنسجة (TCP) وطريقة أجار الكونغو الأحمر (RCA) لدراسة تكوين الأغشية الحيوية من خلال تقييم تأثير تركيز كلوريد الصوديوم ودرجة الحموضة و H_2O_2 والإيثانول وكذلك نفاذية السلالات من الماء. بصرف النظر عن التنشيط والتحقق من السلالات المحفوظة، لم يتم الحصول على أي نتائج تتعلق بإمكانية تكوين الأغشية الحيوية بسبب الأزمة الصحية لـ COVID-19.

الكلمات المفتاحية : المكورات العنقودية, الغشاء الحيوي, المورثات icaADBC , RCA , TCP

Introduction

Introduction :

Dans l'environnement naturel, les bactéries présentent une coopération et coordination remarquablement diversifiée et complexe. La majorité des bactéries ont la capacité de passer d'unicellulaire au mode de vie multicellulaire tel que colonies microbiennes et biofilms (**Merani et al., 2018**).

Les biofilms sont l'agrégation des bactéries noyées dans une matrice extracellulaire d'exopolysaccharides autoproduit(EPSS), des protéines et des micromolécules telles que L'ADN. Ils peuvent se former sur les surfaces biotiques et abiotiques (**Puja et al., 2018**).

Les biofilms se trouvent sur des surfaces en contact avec les aliments et la nourriture, et les cellules bactériennes dans les biofilms peuvent être protégées contre divers stress environnementaux tels que les désinfectants, les antibiotiques, le manque des nutriments, le stress osmotique et d'autres contraintes résultant des sources de contamination croisée (**Lee et al., 2014**). Les bactéries dans les biofilms peuvent avoir une meilleure capacité pathogène par rapport à des bactéries en solution en raison de comportement sessile, une résistance accrue aux antimicrobiens et la possibilité de détachement et l'embolisation distale des fragments de biofilms (**Shanks et al., 2006**).

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*, qui comporte les quatre gènes de biosynthèse *icaADBC* nécessaires pour une expression maximale du PIA et le gène de régulation *icaR* (**Touati, 2007**).

Parmi les microorganismes qui ont la capacité de former un biofilm sur les surfaces des équipements, *Staphylococcus* spp. (**Costerton et al., 1995**). Les staphylocoques sont des pathogènes puissants, largement répandus dans l'environnement et capables de provoquer un certain nombre d'infections. Ce sont des germes coriaces qui peuvent survivre dans des conditions de vie difficiles. Ils possèdent un grand nombre de facteurs de virulence qui leur permettent de provoquer des maladies graves par des mécanismes variés (**Di Ciccino et al., 2014**).

Introduction

Les staphylocoques ont une aptitude à former des biofilms adhérant à des surfaces très diverses, avec une implication directe en pathologie humaine (**Bergon., 2016**). La fixation des bactéries sur les surfaces est influencée par les propriétés physico-chimiques de l'environnement (température, pH) et de la bactérie elle-même telle que l'hydrophobicité, production des substances extracellulaires telles que le slime, et la mobilité qui permet aux bactéries de s'adhérer à des surfaces biotiques et abiotiques comme l'acier inoxydable (**Moltz et Martin ,2005 ; Folson et Fank, 2006 ; Shi et Zhu, 2009**).

L'objectif de ce mémoire est d'évaluer la capacité de certaines souches de *Staphylococcus* spp (isolées des infections humaines, animales) à former des biofilms d'une part, et à étudier l'influence des divers facteurs sur ce potentiel d'une autre part. Ce travail comporte 2 parties :

-une mise au point bibliographique qui permet de caractériser le genre *Staphylococcus*, et une étude générale sur les biofilms.

-une partie pratique consiste à la mise au point d'une collection des souches *Staphylococcus* spp isolées des infections humains et animales, et à l'étude de capacité de ces souches à former des biofilms et l'influence de certains facteurs sur ce phénomène.

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

Chapitre I : Etude de genre *Staphylococcus*

I. Historique

En 1876 : Louis Pasteur a révélé et insisté sur l'existence de cette bactérie qu'il avait isolée à la fois du pus de l'anthrax, de l'ostéomyélite et enfin des eaux de la Seine (Duphay, 1972).

En 1879 : Louis Pasteur a observé dans des pus de furoncle et d'ostéomyélite « un organisme unique ; mais très fréquemment associé en petits amas (Berche *et al.*, 1988 ; Famba, 2006).

En 1882-1883 : Alexander Ogston propose le nom «staphylococcus» (staphylé : grappe et kokkos : grain) (Ogston, 1882 ; Hennikene, 2009).

En 1884 : en Allemagne, Anton Julius Friedrich Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries (Avril, 2000). Il différencie ainsi *S. aureus* de *S. albus* par la coloration des pigments produits par les colonies (Hennikene, 2009). *S. aureus* de *S. albus*, du latin « orange » et *S. albus*, du latin « blanche ». (Bakhom, 2004). La même année, les staphylocoques étaient classés parmi les cocci à gram positif (Corn, 2004).

II. Définition :

Les Staphylocoques sont des germes ubiquitaires et commensaux (Davido, 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 ne sont pas uniformes. Il existe des niches préférentielles qui témoignent d'une adaptation de certaines espèces aux différentes régions de peau (Morot-Bizot, 2006).

III. Habitat

Les staphylocoques partagent le même environnement que l'homme. Ils vivent sur lui et survivent sur des surfaces inanimées telles que la literie, les vêtements, les poignées de portes, etc... (Scheater *et al.*, 1999). Les staphylocoques sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre :

- En bactéries saprophytes : dans la nature (sols, air, eaux, aliments...).

- En bactéries commensaux : sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifères).
- En bactéries pathogènes : agents d'infections humaines ou animales qui peuvent être redoutables (**Delarras, 2007**).

Les staphylocoques, en particulier *S. aureus* et *S. epidermidis*, font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des porteurs asymptomatiques. Environ 50% des sujets normaux sont porteurs de *S. aureus* : porteurs persistants, porteurs occasionnels, ou transitoires, Ils sont retrouvés particulièrement dans l'oropharynx, les fosses nasales antérieures qui paraissent être son gîte essentiel (*S. aureus* 30-40%, *S. epidermidis* 30-100%) et au niveau des régions cutanées chaudes (creux axillaires) et humides (périnée, aisselles) ; il n'est pas rare d'isoler *S. aureus* des selles (**Avril et al., 2002**).

IV. Taxonomies et classification:

Du point de vue taxonomique, Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes (bactéries à Gram positif), à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Outre les *Staphylococcus* spp. Et la famille bactérienne des *Staphylococaceae* comprend quatre autres genres moins connus. *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus* spp. Les espèces phylogénétiquement proches les plus connus sont les membres du genre *Bacillus* dans la famille des *Bacillaceae*, qui sont au même niveau que la famille des *Staphylococaceae*. Les *Listeriaceae* composent aussi une famille proche.

Jusqu'à récemment (fin des années 1990), le genre *Staphylococcus* était classé avec *Micrococaceae* avec notamment les genres *Micrococcus* et *Stomatococcus*. Les membres du genre *Staphylococcus* diffèrent cependant de ceux du genre *Micrococcus* entre autres par leur métabolisme anaérobie facultative, par un contenu en G+C compris entre 30 et 39% (contre 63 à 73% pour *Micrococcus*) par leur paroi contenant un peptidoglycane et des acides téichoïques et par la présence de peptide oligoglycine dans les ponts peptidiques de la paroi. Les études génétiques ont permis de reclasser Microcoques au sein du groupe des actinomycètes (**Denis et al., 2016**).

Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 34 espèces et 13 sous espèces qui peuvent être classés en fonction de leur capacité à coaguler le plasma de lapin : on

distingue ainsi les espèces à coagulase positive et les espèces à coagulase négative (Cook D.W. et Rupple A. D , 1992; Bougoudogo *et al.*, 1995)

- **Classification**

- **Classification de Bergey (1994):**

- . Embranchement : Firmicutes.

- . Groupe 17 : Cocci Gram+ Ex famille des *Micrococcaceae*

- **Classification phylogénique des staphylocoques:**

- . Domaine : Bactéria ou Eubactérie

- . Phylum 13 : firmicutes.

- . Classe : Bacilli.

- . Ordre : Bacillales.

- . Familles : *Staphylococcaceae*...

- . Genre *Staphylococcus* avec trente-huit espèces et des sous espèces

V. Espèces du genre *Staphylococcus*

a. *Staphylococcus aureus* :

S. aureus est l'espèce majeure, d'origine humaine, animale, (volaille, bovin, ovin, caprin ...) environnementale ou non spécifique. Elle comporte deux sous espèces avec *S. aureus* subsp. *aureus* et *S. aureus* subsp. *anaeobius* (catalase, pathogène pour des animaux). *S. aureus* subsp. *aureus* est une bactérie pathogène :

- Par virulence ; elle fabrique des protéines de surface et des enzymes dont la coagulase libre et la thermo nucléase recherchées en routine.
- Par toxinogénèse ; elle produit diverses toxines, dont des entérotoxines de différents types antigéniques (A à F), provoquant une intoxication alimentaire ou toxi infection alimentaire ou toxi-infections alimentaire. Des types antigéniques Ga M. d'incidence inconnue, ont été récemment décrits). Le type A est le plus souvent rencontré dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ; il peut être seul ou associé à d'autres types (Delarras, 2007).

b. Autres espèces de Staphylocoques :

D'après les études d'hybridation ADN- ADN, les espèces de Staphylocoques sont réparties en cinq groupes, sauf quatre espèces non rattachés à un groupe: *Staphylococcus lugdunensis*, d'origine humaine. Les espèces de ces cinq groupes,

mentionnées en gras, sont identifiables sur la galerie ID 32Staph bio Mérieux SA. L'origine primitive des espèces est précisée d'après la bibliographie (**Dellarras, 1981**).

Groupe *S. epidermidis*

Ce groupe comporte sept espèces :

Espèces d'origine humaine : *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warner*,

Staphylococcus caprae, espèce d'origine animale et *S. saccharolyticus* d'origine humaine sont également associés à ce groupe *S. aureus* et *S. auricularis*, espèces d'origine humaine.

Groupe *S. saprophyticus*

Il comprend trois espèces d'origine humaine : *Staphylococcus cohnii* (2 sous espèces) *S. saprophyticus*, *S. xylosum*.

Groupe *S. simulans*

Il contient trois espèces : *Staphylococcus carolus* et *S. piscifermentans*, d'origine animale. *S. simulans* d'origine humaine.

Groupe *S. sciuri* :

Il comprend quatre espèces : *Staphylococcus lentus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* d'origine animale et *S. pluvieri* (d'origine humaine et animale). Les souches de cette dernière espèce sont maintenant incluses dans *S. vitulinus*.

Groupe *S. hyicus*

Il regroupe huit espèces, dont une espèce d'origine humaine (*Staphylococcus Schaefer*), et sept espèces anciennes ou de la dernière décennie, (*Staphylococcus chromogenes*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. muscae*).

Des nouvelles espèces d'origine humaine ont été isolées ces derniers ; *Staphylococcus fleuretti* : Staphylocoque à coagulase négative isolé de lait et de fromage de chèvre.

Staphylococcus nepalensis : Staphylocoques à coagulase négative isolé de chèvre népalaise (**Dellarras, 2007**).

Tableau 1: Différence espèces de genre *Staphylococcus* (Garrity *et al.*, 2002 ; Sterpan *et al.*, 2004 ; Federighi , 2005).

Espèces à coagulase positive	
<i>S. aureus subsp aureus</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>S. lutrae</i>	<i>S. aureus subsp. Anaerobius</i>
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	<i>S. delphi</i>
Espèces à coagulase negative	
<i>S. arletae</i> <i>S. kloosii</i>	
<i>S. auricularis</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. capitis subsp. Capitis</i> <i>S. lugdunensis</i>	
<i>S. capitis subsp. Urealyticus</i> <i>S. muscae</i>	
<i>S. caprae</i>	<i>S. nepalensis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	
<i>S. carnosus subsp. carnosus</i>	<i>S. pasteurii</i>
<i>S. carnosus subsp. putilis</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. chromogene.</i>	<i>S. sacharolyticus</i>
<i>S. cohonii</i>	<i>S. saprophyticus subsp. saprophyticus</i>
<i>S. cohonii subsp. pureglyticus</i>	<i>S. saprophyticus subsp. bovis</i>
<i>S. condimenti</i>	<i>S. scheiferi subsp. scheiferi</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. scuri subsp. scuri</i>
<i>S. equorum subsp. equorum</i>	<i>S. scuri subsp. carnatus</i>
<i>S. equorum subsp. linens</i>	<i>S. scuri subsp. prodentiu</i>
<i>S. felis</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. fleuretti</i>	<i>S. succinus subsp. casei</i>
<i>S. gallinatum</i>	<i>S. succinus subsp. succinus</i>
<i>S. hémoliticus</i>	<i>S. warnae</i>
<i>S. hominis subsp. hominis</i>	<i>S. xylosus</i>
<i>S. hominis subsp. novobioseptis</i>	<i>S. vitulinus</i>

VI. Caractères morphologiques

Staphylocoques sont des cocci à Gram de positif de 0,5 à 2,5µm de diamètre (Trouillet, 2011) qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappes de raisin d'où leur nom (en grec *staphylos*) ; ils sont immobiles, asporulés et ne

possèdent pas de capsule, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourés d'une pseudo-capsule (Federighi, 2005).

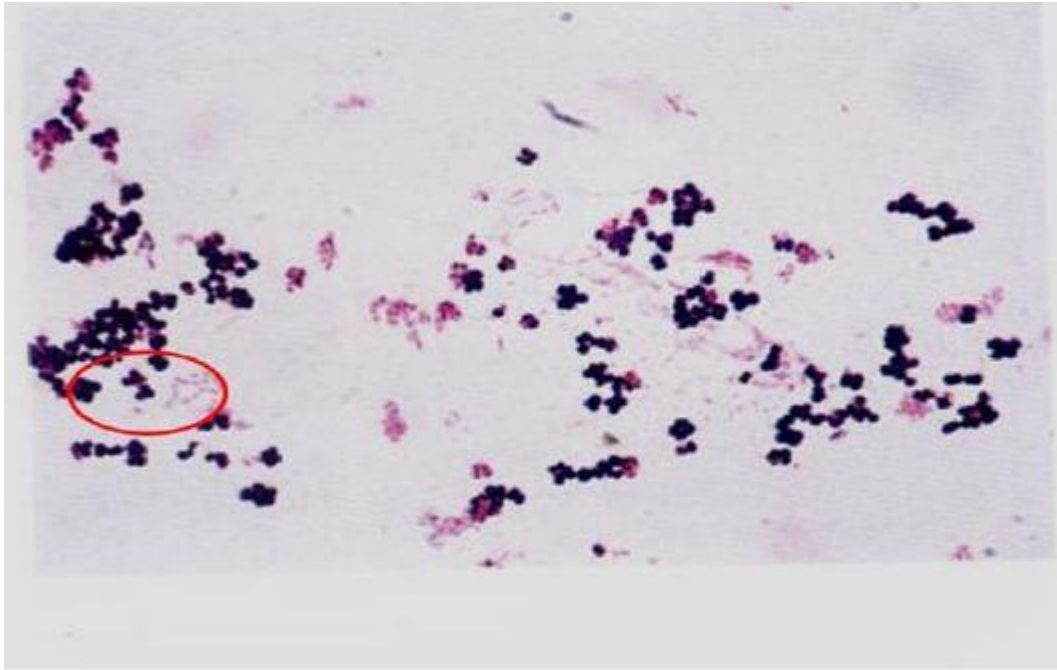


Figure 1: Observation microscopique des Staphylocoques (Spicer, 2003).

VII. Caractères cultureux:

La plupart des espèces de staphylocoques sont aéro-anaérobies facultatives, à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subsp *anaerobius*, qui sont anaérobies strictes (Konate, 2001).

Ils sont résistants à la dessiccation et peuvent croître en présence de chlorure de sodium à 1%. Ces propriétés facilitent leur survie dans l'environnement et la croissance dans les aliments (Bohach, 2008).

Les staphylocoques sont des bactéries peu exigeantes et peuvent être isolés en bouillon ou sur milieux solides simples tels que géloses ordinaires ou géloses au sang à 35-37°C en anaérobiose. Sur les milieux usuels, les colonies de Staphylocoques, de taille variable (1 à 3 mm après 24 heures d'incubation) sont circulaires, opaques, légèrement bombées ou aplaties. À noter que certaines espèces comme *S. saccharolyticus* ou *S. aureus* subsp *anaerobius* cultivent plus lentement et préférentiellement en présence de

co2 .Les souches de type small colony variants (SCV).notamment associées aux infections chroniques ,sont-elles défectives pour certains gènes du métabolisme ,et présentent une culture plus lente, sur milieux enrichis ,avec une morphologie et des caractères phénotypiques atypiques .La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou au jaune orangé . Sur gélose au sang, les souches<<typiques>> de *S. aureus* peuvent produire des colonies de couleur jaune doré, entourées d'une hémolyse. La plupart des espèces SCN, dont certaines peuvent également présenter un halo d'hémolyse sur gélose au sang, ne peuvent être différenciées entre elles après une culture de 24 heures (Denis et al, 2016).

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (Kloos et Bannerman, 1999). Après culture de 24 heures sur gélose au sang, les colonies qu'ils produisent sont de plus grand diamètre que celles produites sur gélose nutritif. Ainsi, une pigmentation peut être observée où la couleur varie selon l'espèce, le caractère pigmentaire n'est donc pas propre à l'espèce (Couture, 2000).

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 h à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations de NaCl jusqu'à 7,5%, ce milieu sélectif rendu différentiel par l'addition du Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol, permet à la fois d'isoler le staphylocoque à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers un *S. aureus* ou un *S. epidermidis* (Fasquelle, 1974 ; Couture, 1990; Le Minor et Veron, 1990).

VIII. Caractères biochimique:

Les staphylocoques possèdent de nombreux enzymes capables de catalyser de nombreux substrats (Delarras, 2007). Tous les staphylocoques ont les caractéristiques suivantes :

- Présence d'une catalase qui décompose l'eau oxygénée.
- Absence d'une oxydase.
- Fermentation du glucose sans production de gaz (Delarras, 2007).

Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, habituellement catalase +. Chimio-organotrophes, Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique. Ils possèdent aussi une chaîne de transport électronique adaptée à la respiration et en particulier des cytochromes de type a et b. Malgré leur aptitude à la fermentation lactique on ne peut donc pas les considérer comme des bactéries lactiques (**Leclere et al, 1995**).

IX. Transmission

Le mode de transmission principal des staphylocoques est le contact direct (infections cutanées ou muqueuses) ou indirecte (transmission par l'intermédiaire de l'environnement) qui est fréquent en milieu hospitalier notamment à partir des vêtements, de la literie, du matériel médical, de la poussière et de l'air. Les corps étrangers comme les dispositifs intravasculaires (cathéters, valves) ou les prothèses orthopédiques constituent également des facteurs favorisants (**Dohin et al, 2007**).

X. Pouvoir pathogène

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**).

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 et Jones, 2009; Koksall et al., 2009; Otto, 2009; Morad-Asaad et al., 2016**).

X.1. Chez l'homme :

X.1.1. 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).

X.1.2. 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 (Koksal *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.*, 2002).

X.1.3. Infectionssystemiques :

X.1.3.1. 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 impétigo), 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). 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).

X.1.3.2. 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).

X.1.4. 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. *S.aureus* présente 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* subsp. *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).

X.1.2. 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* subsp. *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. hyicus* est à l'origine de diverses lésions cutanées. Chez les bovins, la principale infection est la mammite Staphylococcique 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. simulons*, *S. chromogènes*, *S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* ...) (Chiang *et al.*, 2008).

X.2.1. 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 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 (Descoteux, 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 et Sérieys, 2002). Ces germes sont plus fréquemment à l'origine de 16 mammites subcliniques et chroniques, rendant leur diagnostic et leur contrôle difficile (Wallemacq *et al.*, 2010).

X.2.2. Staphylococcies aviaires :

La staphylococcie est une maladie septicémique courante chez les volailles, affectant surtout les dindes et les poulets de chair, due à la bactérie *Staphylococcus aureus*. La maladie se traduit généralement par une arthrite, une synovite, une

ostéomyélite, une dermatite gangreneuse, une omphalite et une septicémie. D'autres espèces d'oiseaux dont les canards, les oies, les psittacidés, les passereaux et les oiseaux sauvages, sont aussi sensibles à *S. aureus* (**Shivaprasad, 2016**).

Les infections staphylococciques fréquentes chez les oiseaux, sont généralement dues à *Staphylococcus aureus* elles peuvent être observées chez la plupart des espèces ou elles déterminent des lésions suppuratives a localisations multiples. Il faut aussi remarquer que 50% des souches de *Staphylococcus aureus* peuvent produire une toxine (**Rechidi-Sidhoum Brugère-Picoux, 1992**). Elles sont classiquement réparties en deux grands groupes, le groupe des toxines ayant une action sur les membranes cellulaires et le groupe des toxines super antigéniques (**Genestier et Lina, 2001**).

XI. 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 (**Fomba, 2006**). Ces facteurs codent pour des protéines de surface ou des exoprotéines 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 inertes (corps étrangers, prothèses) et de production d'un biofilm qui est le principal facteur de virulence de ces bactéries (**Al Alam, 2008**).

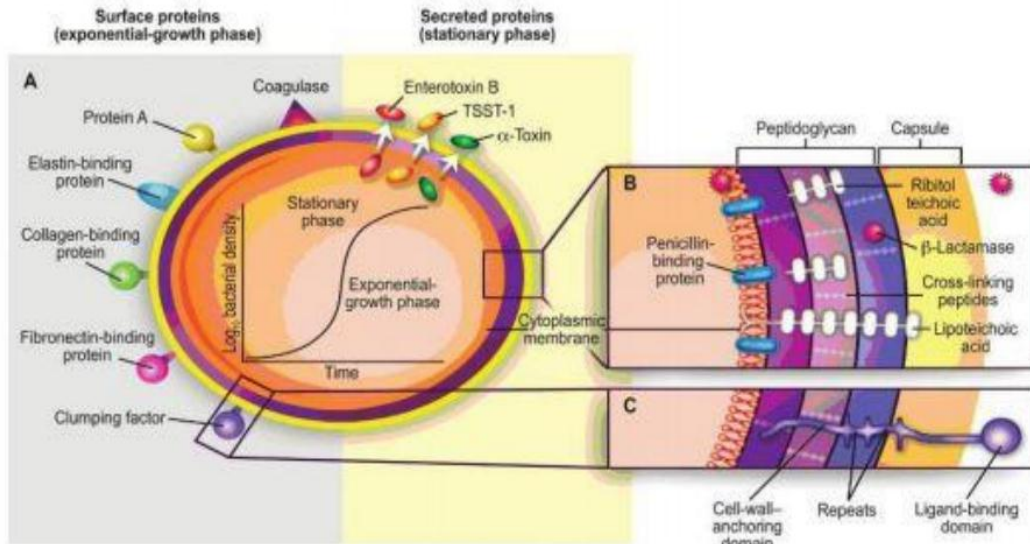


Figure 2:Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* (Al Alam, 2008).

XI.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).

XI.1.1. Toxines de syndrome de choc toxique (TSST)

Au cours de ce syndrome on observe notamment un rash érythémateux avec ou sans desquamations. Les staphylocoques responsables produisent une toxine (TSST+1) sensible aux enzymes protéolytiques, antigéniques et d'une masse moléculaire de 20000 daltons : ce syndrome a également été associé à la production d'entérotoxines ; cette toxine est produite par 90% des souches isolées dans les syndromes de choc toxique et par 11% des souches hospitalières tout-venant. « Succinic oxidase factor cette toxine inhibe l'oxydation du succinate p.ar les mitochondries isolées du foie de souris (Avril *et al.*, 1992).

XII.1.2. Hémolysines :

Il existe trois types :

- Alpha- hémolysine ou alpha toxique staphylococcique est de nature protéique thermostable, Elle est cytotoxique et cytolytique pour une grande variété de types cellulaires cibles. Elle semble s'insérer dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles elles permettent le passage de molécules de petite taille (**Avril et al., 1992**).

- Bêta- hémolysine est thermolabile. Elle agit comme une sphingomyélinase de type C et donne une hémolyse accrue en présence de souches de *Streptococcus agalactiae* c'est le CAMP-test (du nom de leurs découvreurs : Christie, Atkins, Munch-Petersen)

- Gamma –hémolysine comporte deux facteurs I et II agissent en synergie purifié ; provoque une dérmoneurose chez le lapin. Leffet toxique sur les leucocytes serait dû à une modification de la perméabilité cationique. On distingue 2 constitués F et S agissent en synergie (**Avril et al., 1992**).

XII.1.3. Entérotoxines :

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

-Elles sont responsables d'intoxications alimentaires et sont caractérisés par leurs masses moléculaires comprises entre 27800 et 34100 daltons, leurs points iso électrique et leur sérotypie. Elles sont au nombre de 7 : A, B, C1 C2 C3 D E (**Avril et al.,1992**).Les stéréotypes A, B et D Sont les plus fréquents dans les intoxications alimentaires. Certaines de ces entérotoxines ont un effet mitogène sur les lymphocytes T.

-Certaines (EntB) sont des protéines plus thermostables que les autres.

- Elles résistent aux enzymes La dose minimale toxique se situe aux environs de 1(1g pour 100g) d'aliments.

- La détection des toxines dans les aliments, les matières fécales ou les bouillons de culture s'effectue par une technique immunologique (immun diffusion, agglutination, radio immunologie, ELISA).

-La possession d'un gène d'entérotoxines n'est pas exceptionnelle. On retrouve une ou plusieurs de ceci chez la moitié des souches hospitalières, Ce qui rend délicat le rattachement d'un syndrome clinique à l'isolement d'une souche entérotoxigène (**Avril et al., 1992**).

XII.1.4. Les toxines épidermolytiques (ou exfoliatines)

Les toxines épidermolytiques (ou exfoliatines) sont produites par certaines souches de *S. aureus* (5%). Ce sont des protéines d'un poids moléculaire de 27000 daltons et antigéniques : 30 à 40%. Des souches du groupe phagique II produisent ces toxines, soit 5% des souches hospitalières. On distingue 2 sérotypes A et B : le gène codant le sérotype A est chromosomique (90% des souches exfoliantes les 2 sérotypes peuvent être produits par une même souche).

Ces toxines (A ou B) entraînent un clivage intra épidermique. Le mode d'action au niveau moléculaire reste inconnu, ces toxines peuvent être mises en évidence sur le souriceau nouveau-né, par contre immunoelectrophorèse ou ELISA. Les souches toxigènes sont particulièrement responsables d'infections néonatales et infantiles : syndrome de Lyell, impétigo bulleux staphylococcique (**Avril et al., 1992**).

XII.1.5. Toxines pyrogènes :

Il existe deux toxines pyrogènes Mitogènes, aspécifiques et antigéniques d'un poids moléculaire de 12000 Daltons réparties en deux stéréotypes A et B. L'effet pyrogène est observé sur le lapin. Ces toxines sont impliquées dans les fièvres scarlatiniformes staphylococciques (**Avril et al., 1992**)

XII.2. Les MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule) :

Sont un ensemble de protéines assurant l'adhésion aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire. Ce sont une famille de protéines fixées au peptidoglycane. D'autres éléments associés à la paroi, comme le peptidoglycane, aurait en plus une activité similaire aux endotoxines. Les acides téichoïques et lipotéichoïques

servent de molécules d’ancrage à certaines adhésines et jouent donc aussi un rôle dans l’adhésion (Lowy, 1998). Une autre famille d’adhésines décrites est Celle des SERAM (secretable expanded repertoire adhesive molecules) dites les nouvelles adhésines. Celles-ci sont produites dans le milieu extérieur et sont représentées par la protéine Eap (extra cellular adherence protein), la protéine EMP (extra cellular matrix binding protein), la protéine Efp (extra cellular fibrinogen binding protein) ainsi que la coagulase (Heilmann, 2011).

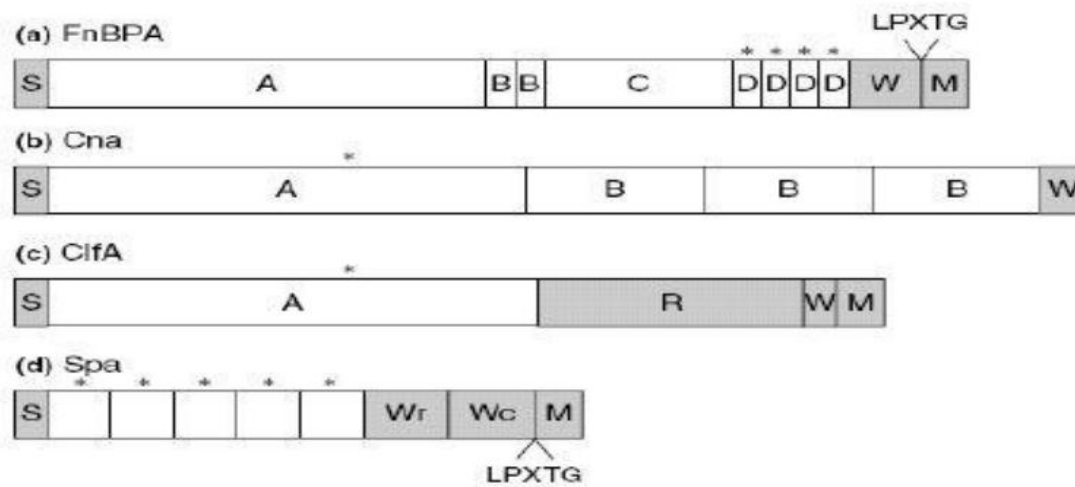


Figure 3: Organisation structurale des protéines de surfaces de *S.aureus* (Jidar,2007). S : séquence signal ; R : répétition du péptide Ser-Asp ; W : région traversant la paroi bactérienne ; M : région d’ancrage à la membrane et contenant des résidus chargés positivement ; A et C : domaines uniques, B et D : domaine répétés, les astérisques indiquent les domaines peptidiques de liaison au récepteur.

XII.2.1. Protéine A

La protéine A dénommée Spa pour « Staphylococcal protein A » fut la première MSCRAMM décrite chez *S. aureus*. Elle est composée de cinq domaines extracellulaires désignés E, D, A, B et C et deux domaines d’ancrage à la paroi Wr et Wc (Lofdahl *et al.*, 1983 ; Uhlen *et al.*, 1984) (Figure3). 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).

XII.2.2. Protéine EbpS

Chez *S. aureus*, la protéine EbpS lie l'élastine présente dans les tissus tels que les poumons, la peau, les vaisseaux sanguins... (**Downer et al., 2002**). Cette protéine ne possède ni peptide signal, ni de motif LPXTG, ni de domaine hydrophobe dans sa partie C-terminale. EbpS est une MSCRAMM associée à la membrane et non à la paroi comme cela avait été initialement décrit (**Park et al., 1996**). Récemment, une étude a démontré que l'EbpS était impliquée uniquement dans la liaison à l'élastine et à la tropoélastine solubles (**Roche et al., 2004**). Compte tenu de sa structure atypique De MSCRAMM, EbpS aurait une autre fonction que l'attachement à la matrice extracellulaire (**Downer et al., 2002**).

XII.2.3. Protéine Cna

Les protéines du collagène étant des constituants majeurs de la matrice extracellulaire (**Gras, 2006**). Chez *S. aureus*, la protéine Cna permet d'adhérer aux tissus contenant du collagène comme le cartilage. Elle contient uniquement les domaines A et B (Figure 3). Son site de liaison au ligand est situé dans la partie N-terminale du domaine A (**Foster and Hook, 1998**).

XII.2.4. Protéines ClfA et ClfB

Ces protéines lient le fibrinogène grâce au domaine A contenant le site de liaison au ligand dans la partie N-terminale (Figure3).

Elles appartiennent à une famille multigénique « Sdr » de protéines de surface putatives, caractérisées par un domaine commun, le domaine R. Ce domaine est composé d'une répétition du dipeptide Sérine-Asparagine appelé Sdr pour « SD repeats ». Il existe d'autres protéines Sdr (SdrC, SdrD, SdrE) mais leurs rôles dans l'infection de l'hôte sont mal déterminés aussi bien chez *S. aureus* que chez *S. epidermidis* (**Foster et Hook, 1998 ; Josefsson et al., 1998 ; McCrea et al., 2000**).

Chapitre II :

Les biofilms

Chapitre II : Les biofilms

I. Historique

D'après les recherches les plus récentes, les bactéries étaient apparues sur Terre il y a environ 3,6 milliards d'années ; soit bien avant l'apparition de l'Homme lui-même, il y a environ 100 000 années. L'homme ne se doutait pas de l'existence même des microorganismes jusqu'au 17^{ème} siècle, lorsqu'Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) a développé le premier microscope (**Alnnasouri ,2010**). C'est aussi durant cette période qu'Antoni Van Leeuwenhoek a décrit pour la première fois les "biofilms" (Irim, 2010) après observation des communautés de microorganismes à la surface des dents avec son propre microscope primitif (**Rochemontex, 2009 ; Othmani, 2014 ; Djelloul, 2009**).

En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement (**Henrici, 1933**).

Heukalakian et Heller .(1940) observent « l'effet de bouteille » : la fourniture d'un substrat solide auquel des microorganismes marins peuvent s'attacher augmente leur croissance et activité métabolique.

En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension (**Zobell, 1943**).

En 1978, John William Costerton a élaboré et a présenté la théorie des biofilms en suggérant que ce serait le mode de vie naturel de la plupart des microorganismes (**Benduah, 2008**).

Les biofilms peuvent aussi se présenter sur des matériaux médicaux comme le cathéter comme l'a démontré **Christensen et al ., 1982**. qui ont été les premiers à observer la formation d'un biofilm chez une souche de *Staphylococcus epidermidis* isolée d'un cathéter. Par ailleurs, ils ont développé des procédés d'obtention de biofilm en tube plastique et en plaque de micro-titration qui sont devenus aujourd'hui des méthodes de références pour sélectionner des souches formant des biofilms (**Planchon, 2006**).

II. Définition :

La définition d'un biofilm a beaucoup évolué depuis sa découverte attribuée à Van Leeuwenhoek au 17^{ème} siècle. Le biofilm est une communauté de microorganismes, qui peut se composer d'une seule espèce de bactéries ou de champignons ou plus fréquemment de multiples espèces variées. Elles sont séparées par des espaces libres parcourues par des canaux aqueux et dépourvues de bactéries (**Roux *et al.*, 2006**).

Le biofilm est une communauté de bactéries attachées entre elles de façon irréversible à une surface biotique ou abiotique par sécrétion d'une matrice protectrice et complexe de substances exopolymériques appelées EPS (ExoPolymeric Substances) (**Alnasouri, 2010**). Bill Costerton a défini le biofilm comme un ensemble de cellules immobilisées sur un support, le plus souvent incluses dans une matrice de polymères extracellulaires (**Costerton, 1999**). Les biofilms rencontrés dans les environnements naturels sont le plus souvent hétérogènes et constitués de différentes espèces microbiennes (**Branda *et al.*, 2005**).

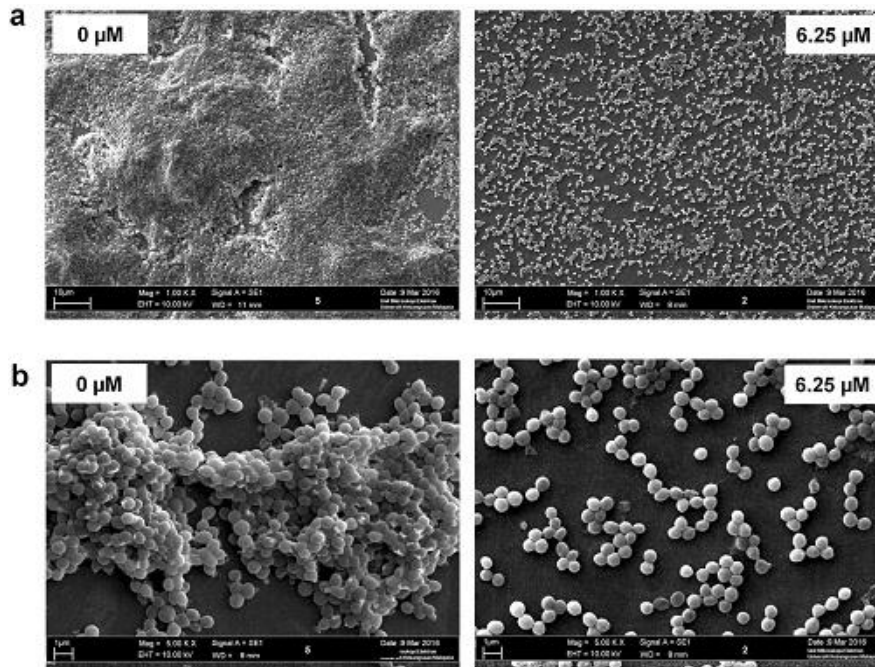


Figure 4: micrographies par microscope électronique à structure du biofilm *S.aureus*. (**kong *et al.*, 2018**). (a) non traités (0µM) et traité a l' UM- C 162 (6,25 µM) après l'incubation (1000x)(b)grappe de cellules dans *S. aureus* non traité (0 µM) et absence de l'agregats cellulaire dansUM-C162 les bactériestraités(6.25 µM) (5000x grossissement).

III. Etapes de formation d'un biofilm Staphylococcique :

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (**Annous et al., 2009**), telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (**Vu et al., 2009**).

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les Milieux aquatiques et/ ou sur les équipements de l'industrie agroalimentaire (**Talaro, 2008**).

Mack et al. (1994) ont proposé un modèle de formation de biofilm en deux phases chez les staphylocoques : l'attachement initial et l'accumulation. Ils ont montré que ces deux phases peuvent être génétiquement séparées (**Mack et al., 1994**). 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**).

III.1. Adhésion ou attachement :

L'adhésion initiale aux surfaces mettant en jeu un certain nombre de mécanismes physicochimiques et biologiques complexes. Elle est généralement divisée en deux phases (**Baillif et al., 2010**).

a) Adhésion réversible:

Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals et électrostatiques). A ce stade, la bactérie peut résorber de la surface et retrouver son état planctonique (**Spiers et al., 2003**) ; (**Kuchma et al., 2005**).

Une fraction des cellules atteignant la surface s'adsorbe de manière réversible. Des facteurs tels que : l'énergie disponible, la fonctionnalité de surface, l'orientation bactérienne, la température et les conditions de pression sont des variables environnementales locales qui contribuent à l'adhésion bactérienne. Si les forces répulsives sont supérieures aux forces d'attraction, les bactéries se détacheront de la surface. Ceci est plus susceptible de se produire avant le conditionnement d'un substrat (**Garrett et al., 2008**).

b) Adhésion irréversible:

Un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible restent immobilisées et deviennent irréversiblement adsorbées. Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient leur adhésion devient plus solide et elles se différencient, en modifiant leur schéma d'expression génique de manière à favoriser leur survie. Ce processus est habituellement le résultat d'un type de communication bactérienne appelée Quorum Sensing (QS) (Garrett *et al.*, 2008 ; Philips *et al.*, 2011).

III.2. Maturation

Une fois que l'attachement des cellules bactériennes à la surface sera définitif, celles-ci vont s'agréger entre elles et former des microcolonies (Götz *et al.*, 2002).

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)

Parmi les facteurs responsables de l'agrégation intercellulaire chez les staphylocoques, se trouvent principalement trois composés de surface telles que l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA) décrite chez *S. epidermidis*, *S. aureus* mais également chez *S. caprae* (Mack *et al.*, 1996 ; Cramton *et al.*, 1999 ; Allignet *et al.*, 2001), la protéine associée à l'accumulation « Accumulation Associated Protein » (AAP) décrite chez *S. epidermidis* (Hussain *et al.*, 1997) et la protéine associée au biofilm « Biofilm Associated Protein » (BAP) décrite initialement chez des souches de *S. aureus* d'origine bovine (Cucarella *et al.*, 2001).

III.3. Détachement :

Une fois la taille maximale du biofilm atteint, différents mécanismes de dispersion vont intervenir (Götz *et al.*, 2002).

Les bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnement après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement

Chapitre II : Les biofilms

de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (**Kaplan, 2010**).

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, 2011; McDougald et al., 2012**). Chez les bactéries, **Stoodley et al. (2001)** ont montré que le détachement spontané de cellules est divisé en 2 processus, l'érosion et le « sloughing ». L'érosion est un détachement continu de cellules uniques et de petits agrégats de cellules tandis que le « sloughing » est la perte massive et rapide du biofilm. L'érosion se produit pendant toute la période de maturation du biofilm tandis que le « sloughing » fait suite à une carence nutritionnelle (**Donlan, 2002 ; Stoodley et al., 2002**).

L'étape de détachement semble être programmée génétiquement, elle faciliterait ainsi la dissémination de l'infection et/ou la colonisation d'autres sites (**Wrangstadh et al., 1986 ; Lee et al., 1996 ; Allison et al., 1998 ; Costerton et al., 1999**).

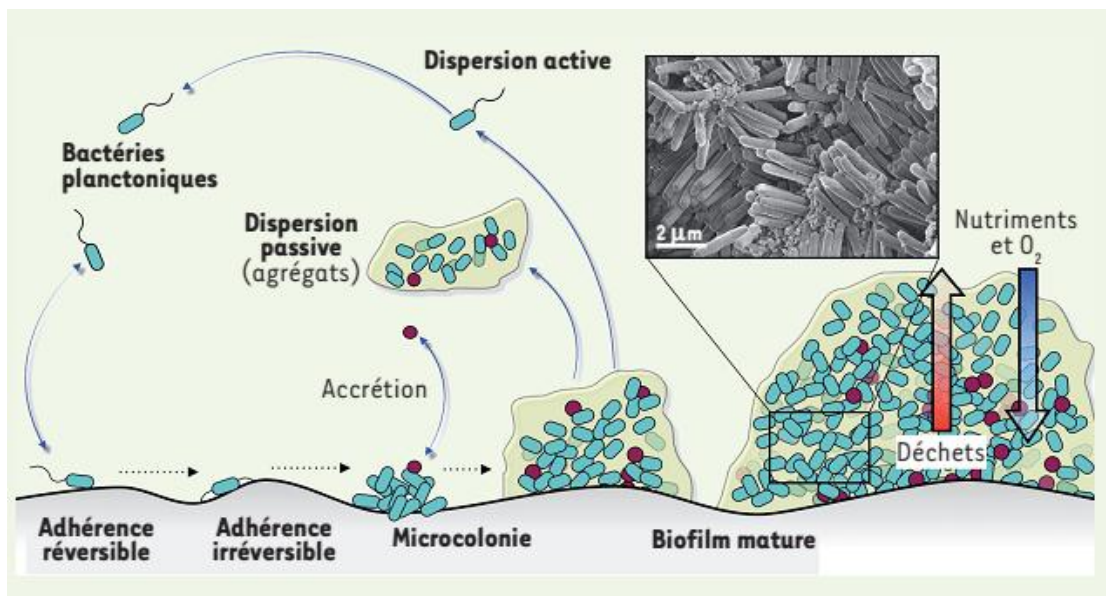


Figure 4 : Les principales étapes de la formation du biofilm (Lebeaux et Ghigo, 2012).

IV. Composition et architecture du biofilm

Un biofilm est approximativement constitué de 90% de matrice extracellulaire d'exopolymères et de 5% de microorganismes (Bellifa, 2014). La composition de la matrice extracellulaire du biofilm est très diversifiée. Cependant, comme elle est hautement hydratée, son composant majeur est l'eau parce qu'elle peut en contenir jusqu'à 97% d'eau (Yannick *et al.*, 2014 ; Charlebois, 2015).

Les polysaccharides font partie aussi de sa fraction majeure car la majorité de ces composés sont de longues molécules linéaires ou branch es, possédant une masse entre 0,5.10⁶ à 2.10⁶ Daltons (Charlebois, 2015).

Cette matrice peut être aussi constituée de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides, de cations et de la cellulose. Ces derniers sont fréquemment retrouvés chez diverses espèces et genres de bactéries. Il faut mentionner que la composition de la matrice du biofilm varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (Yannick *et al.*, 2014).

Cette matrice a un rôle structurel et un rôle protecteur pour les cellules, limitant par exemple la pénétration de molécules antimicrobiennes (Beloin *et al.*, 2008).

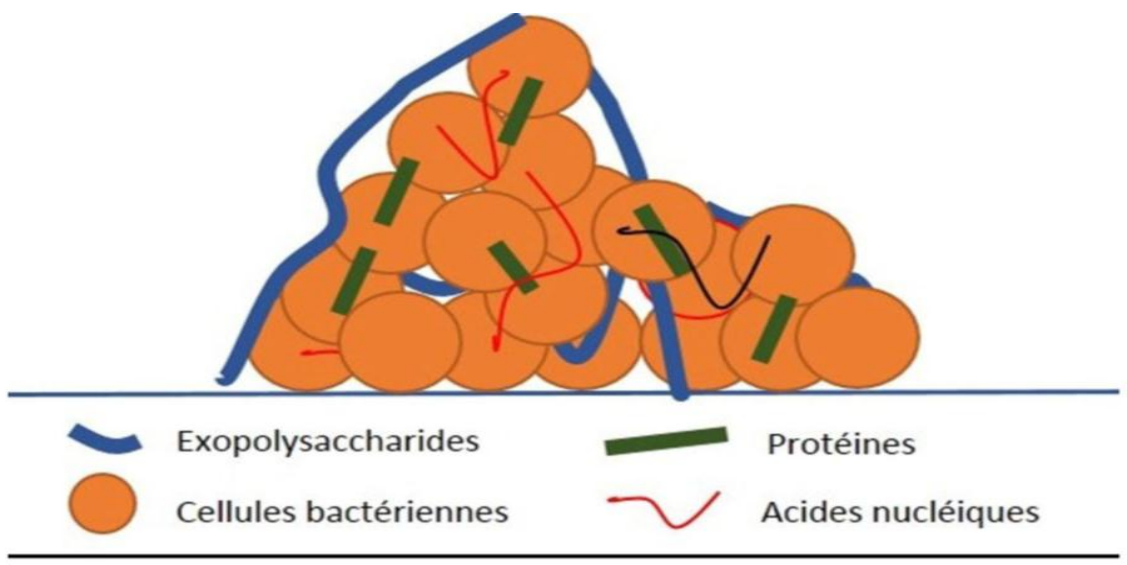


Figure 5: Composition du biofilm Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Götz *et al.* , 2002).

D'un point de vue structural, les biofilms sont hétérogènes et se forment sur des supports variés. Ils ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de microorganismes. Lorsqu'ils sont matures, les biofilms des écosystèmes naturels conduisent à une architecture tridimensionnelle où les micro-colonies peuvent exister sous la forme de structures rappelant la forme de champignons ou de piliers cylindriques. Un réseau de canaux s'intercale entre ces structures pour fournir un accès aux nutriments et à l'oxygène (Costerton *et al.*, 1995 ; Donlan, 2002).

Compte tenu de l'hétérogénéité structurale et microbiologique au sein d'un biofilm, l'expression des gènes peut être très variable. Elle résulte de nombreux facteurs parmi lesquels la limitation de diffusion dans le biofilm des nutriments et de l'oxygène, les variations de pH et la concentration en métabolites bactériens (Stoodley *et al.*, 2002 ; Jefferson, 2004).

V. Quorum Sensing

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de Quorum-Sensing (QS). C'est un système de communication entre les micro-organismes pour répondre aux modifications de l'environnement, basé sur la synthèse, l'émission et la

réception par les cellules de facteurs moléculaires diffusibles « **les auto-inducteurs** » (Pearson, 1997).

Suivant la concentration d'auto-inducteur dans le milieu, les bactéries déclenchent des mécanismes synchronisés au sein du biofilm comme l'expression de facteurs de virulence, le développement du biofilm (détachement ou attachement de nouvelles bactéries) (Tomlin, 2005).

Ces petites molécules s'accumulent jusqu'à une concentration seuil (quorum) qui une fois atteinte engendre une cascade de signalisations aboutissant à une réponse adaptée et coordonnée de toutes les cellules d'une même espèce (Bassler, 2002 ; Camara *et al.*, 2002 ; Fuqua et Greenberg, 2002 ; Waters et Bassler, 2005).

VI. Facteurs impliqués dans la formation de biofilm chez les staphylocoques :

VI.1. Facteurs impliqués dans l'adhésion initiale

VI.1.1. Interactions physicochimiques

La nature de la surface bactérienne détermine les interactions microorganisme-support (Reifsteck *et al.*, 1987 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Ainsi, les interactions physicochimiques entre une surface bactérienne et un support résultent d'une combinaison de forces de Van der Waals, de forces électrostatiques, de propriétés acide-base de Lewis et de liaisons hydrophobes (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996 ; Briandet, 1999 ; Krepsky *et al.*, 2003).

- **Forces de Van der Waals** : interviennent entre des molécules neutres. Elles sont de faible intensité contrairement aux liaisons chimiques et généralement attractives (Briandet, 1999 ; Gross *et al.*, 2001).
- **Forces électrostatiques** : interviennent entre des molécules chargées. Elles sont répulsives dans le cas où les deux corps interagissant sont de même charge et attractives dans le cas contraire. Les charges de surface des bactéries sont essentiellement dues aux acides téichoïques et aux protéines (Sonohara *et al.*, 1995 ; Briandet, 1999).

- Interactions acide-base de Lewis :

Les protéines exposent leurs groupements chargés négativement (COO^-) ou positivement (NH_3^+) au niveau de la surface bactérienne résultant ainsi d'une charge globale négative, positive ou neutre.

- **Interaction hydrophobes :** Ce sont des interactions polaires entre les différents groupements des protéines, plus précisément entre des accepteurs et des donneurs d'électrons (**Planchon, 2006**).

VI.1.2. Acide téichoïques :

La présence d'acides téichoïques dans la matrice des biofilms de plusieurs souches de *S. epidermidis* d'origine clinique est bien établi (**Kogan et al., 2006**). **Vinogradov et al. (2006)** ont aussi montré qu'une souche de *S. aureus* pouvait re-larguer des acides téichoïques lors de sa culture en biofilm. Les acides téichoïques anioniques peuvent séquestrer des cations divalents et/ou fournir une barrière physique pour empêcher la diffusion de certaines substances (**Navarre et Schneewind, 1999 ; Peschel et al., 2000**).

Ils interviennent aussi dans l'attachement des protéines comme les autolysines. Ces polymères de paroi interviennent dans l'adhésion bactérienne à une surface abiotique polaire via les différents mécanismes décrits ci-dessus. Toute modification des acides téichoïques va entraîner des modifications de l'adhésion bactérienne à une surface. En effet, les groupes glycérol ou ribitol de ces acides peuvent être estérifiés sur leurs parties hydroxyles par de la D-alanine et du N-acétyl-glucosamine (**Peschel et al., 1999 ; Collins et al., 2002**).

VI.1.3. Adhésines :

Ce sont des protéines de surface permettant à *S. aureus* de se lier à différentes protéines de l'hôte et d'adhérer à des surfaces

VI.1.3.1. Autolysines/adhésines :

Les autolysines sont des hydrolases du peptidoglycane qui jouent un rôle important dans le « turn-over » de la paroi, dans la division cellulaire, la séparation des cellules et la lyse des cellules bactériennes (**Navarre et Schneewind, 1999**). Elles contribuent à la

virulence en facilitant le relargage de toxines et de composants de la paroi immunologiquement actifs. L'autolysine Alt est la première autolysine décrite chez *S. aureus* (Oshida *et al.*, 1995). Une mutation dans le gène *alt* a des effets pléiotropes au niveau de l'enveloppe, le mutant isogénique délété de *alt* présente une inhibition complète du « turn-over » de la paroi et une diminution générale du taux de protéines à la surface de la cellule (Takahashi *et al.*, 2002).

VI.1.3.1. MSCRAMMs

Ces protéines servent de récepteurs aux protéines du plasma adsorbé à la surface du matériel médical (cathéters, prothèses...) favorisant ainsi la colonisation par *S. aureus* (Navarre et Schneewind, 1999). Lors de l'infection de tissus, *S. aureus* va adhérer aux molécules de la matrice extracellulaire de l'hôte et former un biofilm (Götz, 2002).

VI.1.3.1. Protéine A :

Elle permet l'attachement de *S. aureus* au facteur de Von Willebrand qui est présent au niveau des lésions épithéliales (Navarre et Schneewind, 1999 ; Hartleib *et al.*, 2000). Elle joue un rôle d'adhésine pendant la première phase de l'infection endovasculaire. La protéine A peut aussi interagir avec les filaments d'actine au niveau des cellules épithéliales ce qui permettrait l'internalisation de *S. aureus* et/ou sa dissémination (Jung *et al.*, 2001).

Cependant, d'autres protéines chez *S. aureus* sont également capables de se lier à la matrice extracellulaire de l'hôte telle que Eap pour extracellular adherence protein (Harraghy *et al.*, 2003). Ebh pour Extracellular matrix binding homologue protein (Clarke *et al.*, 2002) et Emp pour extracellular matrix binding protein (Hussain *et al.*, 2001).

VI.2. Facteurs impliqués dans l'agrégation intercellulaire

VI.2.1. L'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA)

a) Description du PIA

Le PIA est un polysaccharide découvert chez *S. epidermidis* par Mack *et al.* (1992) Il est principalement localisé à la surface de la cellule (Heilmann *et al.*, 1996a ; Heilmann *et al.*, 1996b). Il joue un rôle important dans l'adhésion intercellulaire et de ce

Chapitre II : Les biofilms

fait, a été reconnu comme un facteur crucial dans la colonisation de matériel médical par *S. epidermidis* mais également par *S. aureus* (Mack *et al.*, 1996 ; Gerke *et al.*, 1998 ; Cramton *et al.*, 1999).

Le PIA pourrait aussi agir en coopération avec une autre protéine ou un autre polysaccharide pour entraîner l'hémagglutination des érythrocytes (Fey *et al.*, 1999 ; Rupp *et al.*, 1999). Chez *S. epidermidis*, le PIA est un homoglycane de 28 kDa, de structure linéaire, composé de deux fractions (Mack *et al.*, 1996 ; Götz, 2002).

La fraction 1 (80%) est un polymère de N-acétyl-glucosamine dont les unités sont liées entre elles par des ponts β (1-6) glycosidiques. C'est une chaîne moyenne de 130 résidus de 2-désoxy-2-amino-D-glucopyranosyl (Mack *et al.*, 1996).

Cette fraction contient 15 à 20% de résidus partiellement déacétylés distribués au hasard le long de la molécule la rendant ainsi positivement chargée. La fraction 2 (20%) est décrite comme modérément anionique, structuralement proche de la fraction 1, mais ayant une proportion plus faible de résidus D-glucosaminyl non acétylés et contenant des groupes phosphate et succinate. D'après sa composition, le PIA est à la fois positivement et négativement chargé et donc peut être lié via des forces ioniques au peptidoglycane ou aux acides téichoïques (Mack *et al.*, 1996).

Il n'est pas détruit par digestion à la protéase. Il peut être rélargie de la surface bactérienne par des traitements drastiques comme la sonication ou de fortes concentrations en sel (Heilmann *et al.*, 1996b).

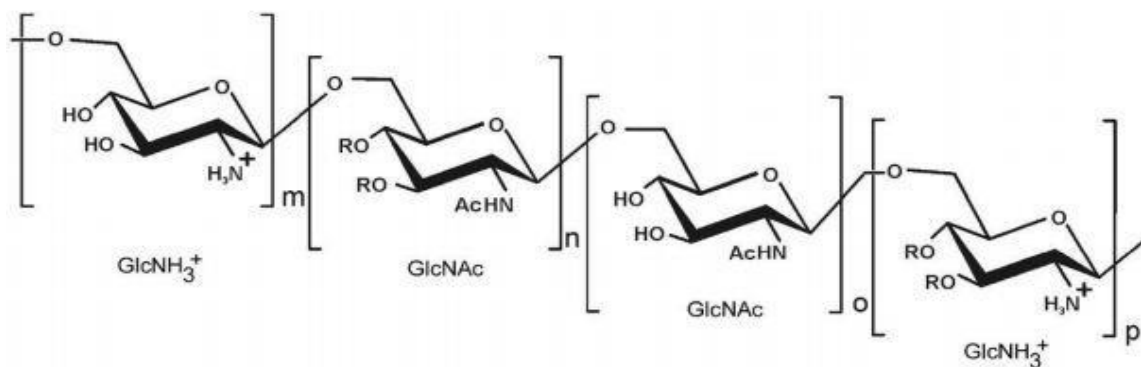


Figure 6: Structure de l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) (Mack *et al.*, 1996).

b) Biosynthèse de 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 (**Heilmann et al., 1996; Cramton et al., 1999**). 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**) 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**).

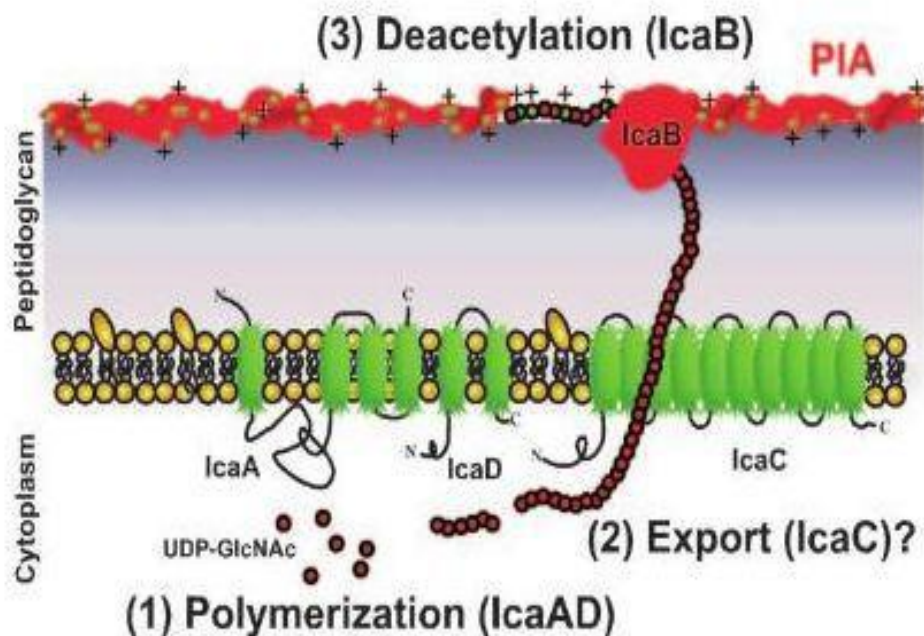


Figure 7: Biosynthèse de PIA chez *Staphylococcus spp* (Liesse Iyamba, 2012).

VI.2.2 Protéine Associée à l'Accumulation (AAP) :

AAP est une protéine extracellulaire de 220 kDa décrite chez *S. epidermidis* (Sun *et al.*, 2005). La protéine AAP sous sa forme native n'est pas fonctionnelle, elle doit être clivée partiellement par des protéases endogènes. Le clivage de la protéine native donne naissance à la protéine tronquée de 140 kDa qui est la forme active impliquée dans l'accumulation cellulaire en biofilm (Hussain *et al.*, 1997 ; Rohde *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2005).

La modulation de l'activité protéolytique permet, via l'activation ou la dégradation d'AAP, la persistance ou le relargage du biofilm de *S. epidermidis* et participe donc à l'étendue de l'infection (Rohde *et al.*, 2005).

VI.2.3 Protéine BAP

Bap pour Biofilm Associated Protein est une protéine associée à la paroi cellulaire d'une masse moléculaire de 239 kDa chez *S. aureus* (Cucarella *et al.*, 2001). 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 et Penades, 2006**).

Les souches de *S. aureus* exprimant la protéine *Bap* sont très adhérentes aux surfaces abiotiques et fortement productrices de biofilm (**Cucarella et al., 2001**). Cette protéine est impliquée à la fois dans l'adhésion intercellulaire mais aussi dans l'attachement primaire à une surface abiotique. Il semblerait que le PIA et la protéine *Bap* coopèrent pour l'agrégation intercellulaire. 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**).

VI.2.4. Protéines SasG et Pls :

Les protéines SasG pour *S. aureus* surface protein G et Pls pour Plasmine sensitive surface protein sont des adhésines de surface de *S. aureus*, impliquées dans l'attachement aux cellules épithéliales nasales desquamées, aux lipides cellulaires et aux glycolipides (**Roche et al., 2003**). Ces deux protéines ont des similitudes de structure avec la protéine associée à l'accumulation (AAP) décrite chez *S. epidermidis* et impliquée dans l'accumulation cellulaire en biofilm (**Roche et al., 2005**). L'analogie entre ces protéines suggère que les protéines SasG et Pls pourraient aussi jouer le rôle d'adhésines intercellulaires.

VI.2.5. Alpha-toxine

Cette toxine joue un rôle dans la formation de biofilm chez *S. aureus* (**Caiazza et Toole, 2003**). Ainsi un mutant isogénique délété du gène *hla* est incapable de coloniser des surfaces plastiques. L'observation au microscope des biofilms de la souche sauvage et de la souche délétée révèle une déficience dans l'adhésion intercellulaire chez le mutant.

VI.2.6. ADN extracellulaire

Chez *S. aureus*, l'opéron *cidABC* régule la lyse cellulaire (**Groicher et al., 2000**). L'inactivation du gène *cidA* entraîne une diminution de la formation de biofilm dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (**Rice et al., 2007**). La comparaison des biofilms de la souche sauvage et du mutant isogénique délété du gène *cidA* révèle qu'il y a une diminution de la lyse cellulaire et moins d'ADN extracellulaire dans le biofilm du

mutant que dans celui de la souche sauvage. De plus, un traitement à la DNase entraîne un détachement massif du biofilm de la souche sauvage mais modéré de celui du mutant. Ces résultats montrent que l'ADN extracellulaire est un constituant important du biofilm de *S. aureus* (Rice *et al.* 2007).

VII. Régulation génétique

Les systèmes régulateurs chez les staphylocoques sont gouvernés principalement par deux loci : l'opéron « accessory gene regulator » (*agr*) et l'opéron « staphylococcal accessory regulator » (*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 « autolysis related locus », semble jouer un rôle dans la formation de biofilm (Liang *et al.*, 2005 ; Toledo-Arana *et al.*, 2005).

Enfin, on trouve des régulateurs de transcription tels que le facteur alternatif sigmaB (SigB), le répresseur « intercellular adhesion repressor » (IcaR) et le facteur « regulator biofilm formation » (rbf), qui influence la formation de biofilm.

VII.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).

Chapitre II : Les biofilms

Agr est l'un des deux systèmes du quorum sensing (QS) initialement décrit chez *S. aureus* puis chez *S. epidermidis* (Recsei *et al.*, 1986 ; Otto *et al.*, 1998). Ce système est largement conservé parmi les staphylocoques (Dufour *et al.*, 2002 ; Ji *et al.*, 2005).

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).

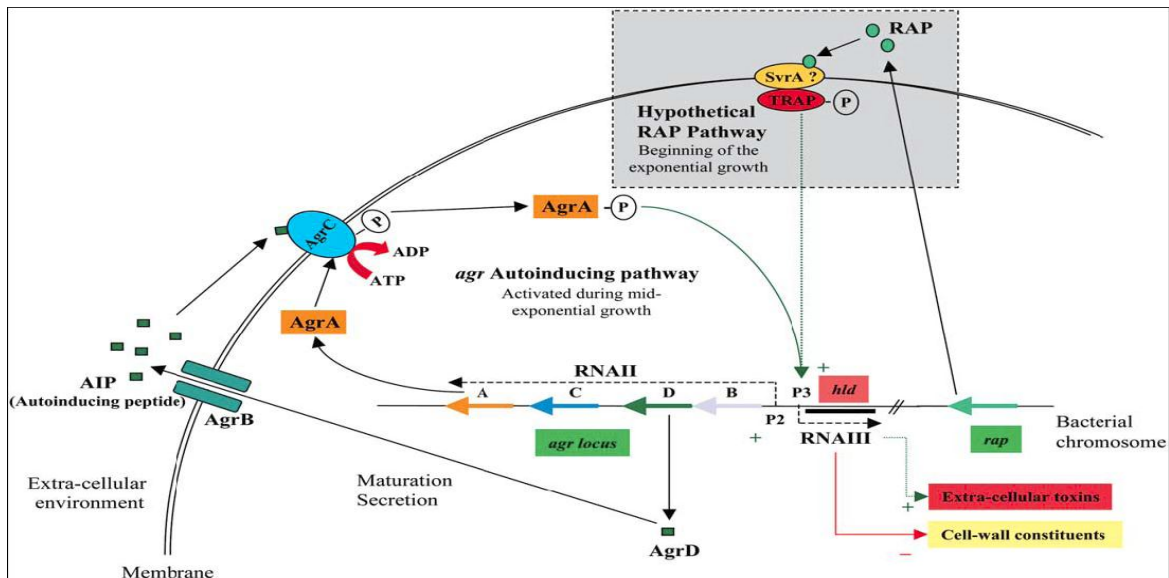


Figure 8 : Fonctionnement du système agr (Bronner *et al.*, 2004)

VII.2. Système SAR (Staphylococcal Accessory gene Regulator):

Le locus sar active chez *S. aureus*, à la fois la synthèse des protéines extracellulaires et des protéines de surface qui sont impliquées dans la formation de biofilm comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I (Manna *et al.*, 1998 ; Shenkman *et al.*, 2001). De plus, le locus sar interagit avec le locus agr dans la région entre les 2 promoteurs (Chien *et al.*, 1998 ; Manna et Cheung, 2001 ; Shenkman *et al.*, 2001).

Chez *S. aureus*, le locus *sar* est composé de trois transcrits chevauchants désignés *sarA*, *sarC* et *sarB* issus de trois promoteurs distincts P1, P3 et P2. Compte tenu de leur nature chevauchante, chacun des transcrits produit SarA qui est une protéine de liaison à l'ADN (Manna *et al.*, 1998 ; Manna & Cheung, 2001).

Le transcrit *sarA* code SarA de 124 acides aminés tandis que le transcrit *sarC* code un cadre de lecture putatif supplémentaire, l'ORF3 (« Open Reading Frame »). Le transcrit *sarB* code SarA, l'ORF3 et un ORF additionnel de 18 acides aminés (ORF4) qui semble essentiel à l'expression complète des transcrits ARNII et ARNIII du système agr chez *S. aureus* (Chien *et al.*, 1998). Un homologue de *sar* existe chez *S. epidermidis* avec une organisation similaire en multi-promoteurs mais diffère à la fois dans l'ordre de ces promoteurs et par l'absence d'ORFs interpromoteurs (Fluckiger *et al.*, 1998).

VII.3. Facteur sigma B (SIGB) :

Les facteurs sigma sont des régulateurs de transcription eux-mêmes régulés au niveau post traductionnel par des facteurs antisigma. Les facteurs sigma jouent un rôle important dans les réponses adaptatives (Miyazaki *et al.*, 1999 ; van Schaik et Abee, 2005).

Ces facteurs forment des complexes avec l'ARN polymérase qui reconnaissent des éléments spécifiques d'un promoteur. Un groupe de facteurs sigma (sigma A) est requis pour l'expression des gènes de ménage ou « housekeeping genes » et un second (sigma B) est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes suite à des changements environnementaux (phase stationnaire, privation nutritionnelle, chocs thermique et osmotique...) (Bronner *et al.*, 2004 ; van Schaik et Abee, 2005). SigB régule directement et indirectement l'expression des gènes de virulence ainsi que ceux impliqués dans la formation de biofilm chez *S. aureus* (Rachid *et al.*, 2000a).

VII.4. Régulateur de la formation de biofilm (RBF)

La protéine Rbf est largement répandue parmi les souches de *S. aureus* ainsi que chez d'autres staphylocoques avec une séquence très conservée suggérant que Rbf est fonctionnellement importante (Lim *et al.*, 2004).

Rbf régule positivement une protéine qui est impliquée dans la formation de biofilm. La protéine RBF contient un motif de liaison à l'ADN similaire à celui de la famille Arac/XylS des régulateurs de transcription. Etant donné que RBFest impliquée

dans l'induction de la formation de biofilm, elle pourrait contenir des domaines fonctionnels de reconnaissance de signaux environnementaux, en plus de ces d

VII.5. Système "Autolysis Related Locus " (ARL R/S)

ARL R/S est un système régulateur à deux composantes permettant à la bactérie de s'adapter aux variations environnementales (**Fournier et Hooper, 2000**). ARL R/S est un membre de la famille OmpR-PhoB des régulateurs de réponse, régulé par les loci *agr* et *sar* (**Shirtliff et al., 2002**). Ce locus est présent chez la plupart des souches de *S. aureus* dans lesquelles il affecte l'adhésion et la formation de biofilm en modifiant l'activité hydrolase du peptidoglycane (**Fournier et Hooper, 2000 ; Shirtliff et al., 2002**)

VII.6. Répresseur de l'adhésion intercellulaire IcaR

Est un répresseur de transcription de l'opéron *ica* chez *S. caprae*, *S. epidermidis* et *S. aureus* (**Allignet et al., 2001 ; Conlon et al., 2002a ; Jefferson et al., 2003**). Le gène *icaR* est localisé en amont de l'opéron *icaADBC* et il est transcrit dans le sens opposé aux 4 autres gènes de l'opéron (**Allignet et al., 2001 ; Conlon et al., 2002a**). Le régulateur *icaR* est un membre de la famille TetR pour « Tetracycline Regulable » des régulateurs transcriptionnels (**Conlon et al., 2002a ; Jefferson et al., 2003**). La plupart des membres de cette famille régulent l'expression de leur propre gène excepté chez les staphylocoques (**Conlon et al., 2002b**). Cette famille de protéines est caractérisée par des domaines conservés de liaison à l'ADN dans la partie N-terminale et des domaines C-terminale divergents impliqués dans des interactions avec d'autres protéines qui moduleraient leur activité régulatrice (**ConGlou et al., 2002a**).

VII.7. Autres régulateurs

Système « *S. aureus* exoprotein expression »(SaeRS) est impliqué dans la régulation globale de certains facteurs de virulence telles que l'alpha et la bêta hémolysine, la coagulase et la protéine A, indépendamment d'Agar et de SarA (**Giraud et al., 1999 ; Novick et Jiang, 2003**).

Système « Staphylococcal respiratory response » (SrrAB) est impliqué dans la régulation de facteurs influencés par des conditions environnementales en oxygène telles que les protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et dans la croissance

en anaérobiose de *S. aureus* (Yarwood et Schlievert, 2003 ; Bronner *et al.*, 2004 ; Pragman *et al.*, 2004).

Système LytRS est impliqué dans l'autolyse donc dans la division et la croissance cellulaire. Son rôle dans la formation de biofilm chez les staphylocoques n'a pas été étudié mais l'étude d'un mutant *lytR* chez *Streptococcus mutans* montre qu'il ne présente ni de déficience dans l'adhésion à une surface, ni dans la croissance en biofilm (Brunskill et Bayles, 1996 ; Chatfield *et al.*, 2005).

Système LuxS initialement découvert chez les bactéries à Gram négatif, a été récemment trouvé chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Xu *et al.*, 2006).

VIII. Facteurs favorisant la formation du biofilm

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

a) La surface

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 influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (De Chalvet et De Rochemonteix, 2009).

b) Les caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessite des facteurs environnementaux clefs (Donlan, 2001) ; (Goller et Romeo, 2008). La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (Dumas, 2007). L'augmentation du pH urinaire entraîne une augmentation de l'attachement bactérien (Donlan, 2001).

La concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques. Les sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez et Casadevall, 2007**).

Les 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 (**Spormann, 2008**). L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (calcium, magnésium) entraîné une augmentation de l'attachement bactérien (**Donlan, 2001**).

c) Propriété des cellules

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 plupart 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 voir 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, 2002**).

Chapitre II : Les biofilms

Tableau 2 : les importants variable intervenant dans la fixation des cellules microbiennes et formation de biofilm (Donlan,2002).

Propriétés du substrat	Propriete du milieu	Propriétés de la cellule
Texture et Rugosité	La vitesse découlement	Hydrophobicité de la surface cellulaire
Hydrophobicité	pH	Fimbriae
Film de conditionnement	Température	Flagelles
	Cations	Substances polymériques extracellulaire
	Présence d'agents antimicrobiens	

IX. Résistance bactérienne à divers agents antimicrobiens liés au biofilm

Plusieurs études ont examiné les mécanismes de résistance des bactéries au biofilm aux divers agents antimicrobiens et des hypothèses ont été proposées. La majorité d'entre elles associent cette résistance à la présence de la matrice extracellulaire (Madoda, 2014).

Les propriétés viscoélastiques de cette dernière produite par les cellules du biofilm incitent tout naturellement à proposer que cette biomasse pourrait jouer un rôle de barrière à la diffusion des antibiotiques (Oubekka, 2012).

La résistance accrue du biofilm aux antibiotiques et désinfectants est liée aux conditions de vie dans le biofilm comme l'hétérogénéité, l'accès aux nutriments, oxygène... Cette résistance pourrait également reposer sur la présence d'une sub-population des bactéries résistantes, capable de résister à des fortes concentrations d'antibiotiques (Roux *et al.*, 2006). Pour la bactérie, le biofilm représente donc un moyen de subsister dans un environnement nocif.

X.Moyens de lutte contre les biofilms

Les biofilms posent de graves problèmes de santé publique. Il est important d'éradiquer les biofilms nuisibles. La lutte contre le biofilm peut se définir selon deux axes principaux : inhibition et élimination.

Il existe plusieurs moyens d'empêcher la formation du biofilm indésirable, comme l'inhibition ou le blocage de l'adhésion réversible ou irréversible, inhibition de la métamorphose du phénotype planctonique en phénotype biofilm (**Delorm, 2012**).

Une fois que les biofilms sont présents, le meilleur moyen de lutter contre ces biofilms est de les détruire. Cela peut s'effectuer en pratiquant l'antibiothérapie à long terme, en ciblant la matrice exopolysaccharide et les bactéries persistantes, et aussi en inhibant le mécanisme de "Quorum Sensing" (**Auger, 2012**).

XI. 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 Hors Will, 2011**) Capables de détruire l'intégrité physique de la matrice du biofilm, constitue aussi une approche.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Lieu d'étude :

La partie pratique de cetted'étude s'était programmé dans le laboratoire de microbiologie de la faculté SNV-ST de l'université de khemis-Miliana et le laboratoire microbiologie de la faculté sciences de l'université de Médéa.

II. Origine des souches :

Afin d'étudier le phénomène de formation de biofilm nous avons procéder à travailler sur des souches de staphylocoques de différentes origines :

Origines animales : des souches isolées à partirinfections animales (lait de mammite chez les ovins)

Origines humaines : des souches isolées à partir, les liquides biologiques des patients hospitaliers (le sperme, l'urine,), des dispositifs médicaux, les cathéters.

II. Isolement et purification

Après incubation des milieux sélectifs ensemencés, les colonies sont repérées selon leurs aspects morphologiques puis elles sont isolées et purifiées surles mêmes milieux jusqu'à l'obtention de colonies pures qui seront identifiées par une :

- Etude de leur caractère macroscopique (aspects des colonies sur milieux gélosés).
- Etude de leur caractère microscopique (forme des bactéries et coloration de GRAM).

IV. Identification

Tout d'abord, les isolats ont été identifiées comme souche staphylococcique sur la base de la morphologie des colonies sur gélose nutritive, la gélose au sang et sel Mannitol Agar, la coloration de Gram, et différents tests biochimiques (**Bergey et Holt, 1994**).

Dans cette étude, nous avons travaillé avec une collection dessouchesidentifiées par MALDI TOF MS (**Achek et al, 2020a, b**).

V. Détection des gènes *icaADBC*

Après l'extraction de L'ADN génomique, la détection des gènes*icaADBC* est faite selon le protocole décrit par **Achek et al., 2020b**. La détection de gènes responsables de

Matériel et méthodes

formation biofilms (*icaA icaC, icaD, bap*) a été réalisée d'une technique de biologie moléculaire des puces à ADN (DNA Microarray).

VI. Revivification et vérification de la pureté des souches

La revivification des souches a été effectuée dans le bouillon nutritif. L'incubation se fait à 37°C pendant 48h.

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* (Leyral et Vierling ,2007).

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

VII. Matériel utilisé :

VII. 1. Matériel non biologique :

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

➤ 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.

Matériel et méthodes

➤ Milieux de culture

- Milieux de culture liquides

- Bouillon cœur cervelle (BHIB).
- Bouillon nutritif (BN).
- Bouillon tryptone soja (TSB)

- Milieux de culture solides

- Gélose Chapman.
- Milieu Rouge Congo Agar.
- Gélose de Baird Parker
- Gélose nutritive

➤ Réactifs :

- Cristal violet.
- PBS : Phosphate buffered saline.
- TSE : Tryptone sel eau.

VIII. Etude de la formation du Biofilm

VIII.1. Méthode du Rouge Congo Agar (RCA)

Selon **Freeman *et al.*, 1989**, la gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime (**Nagaveni *et al.*, 2010 ; Kara Terki, 2014**) (Figure).

Sur ce milieu les souches exprimant le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge pour les souches PIA négatives. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (**Mathur *et al.*, 2006 ; Afreenich *et al.*, 2011 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2014**).

Le milieu estensemencé par des striés serrées à l'aide une anse deplatine, à partir des cultures de 24 heures sur gélose nutritive, puis incubé à 37° pendant 24 heures à 48 heures

Les souches productrices de Slime (Biofilm) donnent des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse ou des colonies bordeaux pour les souches non productrices (**Ziebuhr *et al.*, 2001 ; Aricola *et al.*, 2002**).Les souches de

Matériel et méthodes

phénotype variable donnent des colonies rouges à centre noir ou des colonies noires à centre rouge. Elles ont été considérées comme des souches productrices de Slime (**Touati et al., 2007**).



Figure 10 : Culture sur la gélose Rouge Congo (**Hou et al., 2012**).

A et B : résultat positif / C : résultat négatif

VIII.2. Méthode de plaque de culture de tissu (TCP)

Cette méthode a été décrite en 1985 par le groupe de recherche de **Christensen**, qui a pour but d'évaluer quantitativement la formation de biofilm.

À partir d'une culture pure et jeune de 24h, on ensemence 5 ml de TSB, qu'on incube à 37°C pendant 18 à 24h (**Tré-Hardy et al., 2007**). Après incubation des dilutions appropriées sont effectuées afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente 8 à 10 UFC/ml par ajustement de l'absorbance à 0.08 - 0.1 à une longueur d'onde de 625 nm.

Les puits stériles d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont remplis avec 150µL de cette suspension bactérienne. Les puits de la colonne 12 servant de contrôle, sont remplis avec 150 µL de milieu TSB. Après incubation à 37°C pendant 24h en condition statiques, les puits de la microplaque sont vidés de leur contenu puis lavés trois fois consécutives avec 0.2 ml d'eau physiologique stérile pour éliminer les bactéries libres planctoniques. Les cellules bactériennes adhérentes à la paroi interne des puits et formant un biofilm sont colorées par le cristal violet 0.1% (m/v). Après 10 à 15 minutes, la solution de cristal violet est éliminée et les puits sont lavés trois fois avec de l'eau

Matériel et méthodes

distillée afin d'éliminer toute trace de colorant non fixe. Les microplaques renversées sont couvertes de papier absorbant et laissées

Sécher à la température ambiante pendant 15 minutes.

Enfin, les puits sont remplis de nouveau avec 150 μ L d'une solution d'éthanol I (95%) pour libérer le colorant fixe au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé. La densité optiques (DO) de tous les puits sont déterminées par l'intermédiaire d'un lecteur ELISA a une longueur d'onde 590 nm.

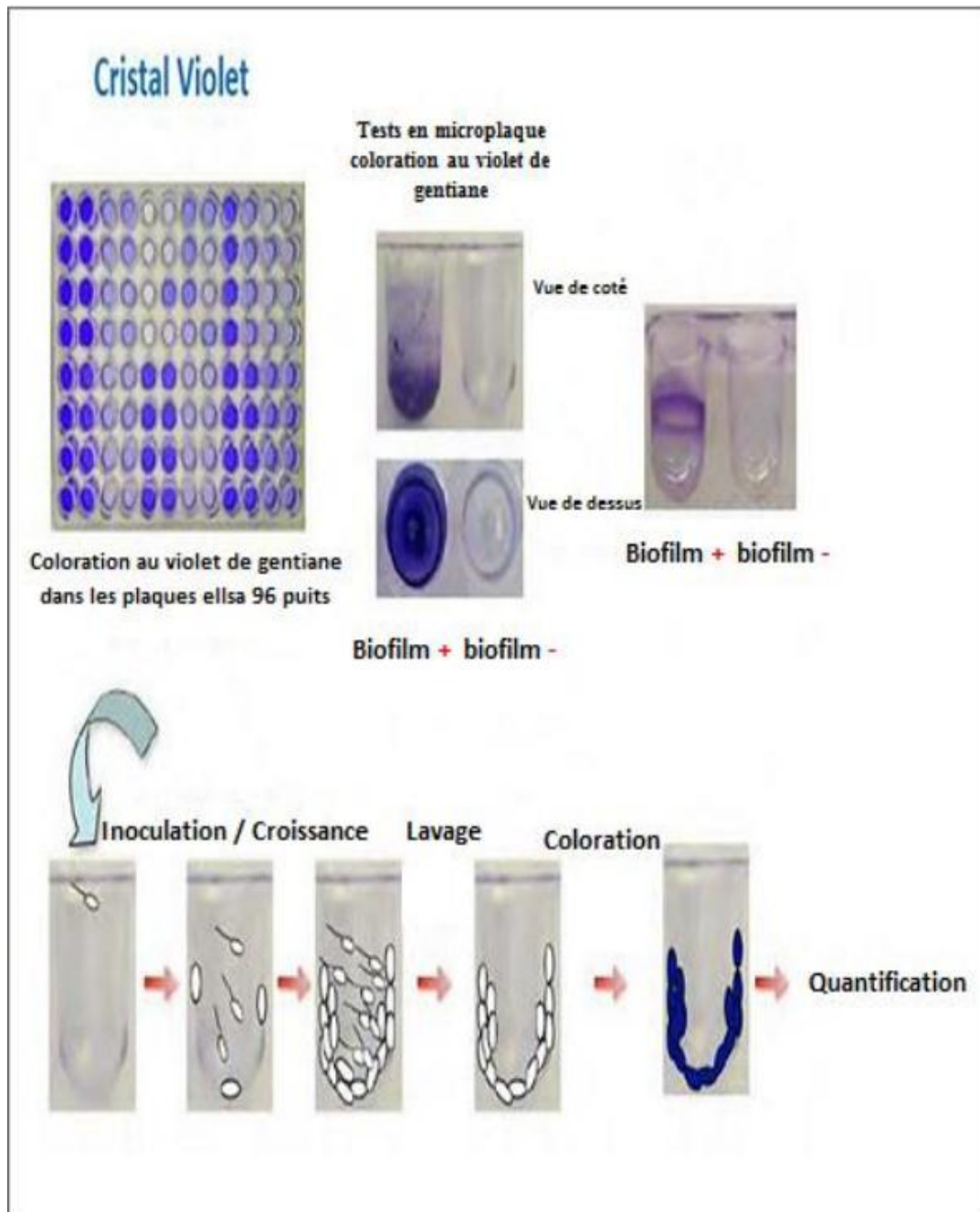


Figure11: Formation de biofilm en microplaque (Bellifa, 2014).

Selon les travaux de (Christensen *et al.*, 1985), les souches comptent 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).

Matériel et méthodes

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

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

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

IX. Etude de l'effet de quelques facteurs sur la formation du biofilm

Dans cette partie d'expérimentation, différents facteurs seront utilisés afin de déterminer leurs effets sur la formation du biofilm par des souches de Staphylocoques.

Les facteurs utilisés sont : le pH, le NaCl, l'éthanol et le H₂O₂, hydrophobicité.

IX.1. Choix des souches :

Le choix des souches sera effectué sur la base du potentiel de formation du biofilm.

- Technique

La technique utilisée dans cette étude est la technique de plaque de culture de tissu (TCP) de *Stapanovic et al., 2007* expliquée auparavant.

IX.2. L'effet du pH :

Afin d'étudier l'effet du pH sur la formation du biofilm, des suspensions bactériennes de **10 ml** à deux valeurs de pH : **4 (acide)** et **8 (basique)** ont été préparées dans le milieu TSB à partir de cultures jeunes de 24h.

Pour la dilution, les deux milieux TSB glucosés utilisés ont été aussi ajustés aux deux valeurs du pH (pH' et pH'').

NB : le pH a été ajusté par l'ajout de deux solutions :

- Le KOH pour l'augmenter (pH'').
- Le HCl pour le diminuer (pH').

Matériel et méthodes

Dans l'étape de remplissage de microplaque, six puits ont été utilisés pour le contrôle négatif, dont trois puits ont été remplis par le milieu TSB (dilué) de pH', et le reste des puits a été remplis par un autre de pH".

IX.3.L'effet de NaCl :

L'isolât sera exposé à des concentrations de NaCl de 0%,2% ,4%, et6% supplémentés en bouillon de soja tryptique(TSB) à 35 ° C pendant 24 h. Suivi d'un étalement de 0,1 ml de la culture sur gélose TSB contenant respectivement 0% ,2% ,4% ,6% de NaCl.

Et 0,1 ml de la culture sera transférée dans 10 ml de TSB. Après incubation à 35°C /24h, les souches sur les plaques seront recueillies et diluées à Do600.puis elles seront incubées sur une plaque à fond plat à 96 puits contenant du TSB plus les concentrations appropriées de NaCl

La formation de biofilm a été quantifiées par coloration au cristal violet après avoir incubée à 35 °C/9h (**Somain *et al.*,2014**)

IX.4. Effet d'éthanol :

Des suspensions bactériennes sont préparées dans deux milieux de TSB : un milieu est supplémenté de **2%** (v/v) d'éthanol et l'autre a été supplémenté de 15%(v/v) d'éthanol, à partir de cultures jeunes de 24h. L'éthanol utilisé est de concentration 99°.

X.5. Effet du H₂O₂ :

Pour l'effet du H₂O₂, des suspensions bactériennes sont préparées dans le milieu TSB supplémenté de 3% (v/v) du H₂O₂ de concentration 33%.

X. Etude de l'hydrophobicité de la paroi bactérienne de *Staphylococcus* spp par la technique MATH (Microbial Adhesion ToHydrocarbon) :

Elle consiste à évaluer l'affinité des cellules vers des solvants apolaires (d'hexadécane).

L'hydrophobicité des souches est évaluée à température sélectionnée : 12 et 37 ° C, par adhésion microbienne à l'essai n-hexadécane (MATH) selon la Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999, avec une légère modification.

Matériel et méthodes

En bref, 4 ml d'inoculum standardisé dans du PBS (OD550 =0,8) sont lavés avec 0,4 ml de n-hexadécane. Après 1 min agitation par tourbillonnement, on laisse les phases à séparer pendant 15 min à température ambiante. Les résultats sont exprimés en proportion des cellules qui ont été exclues de la phase aqueuse, défini par l'équation suivante : $[(A_0 - A) / (A_0 - 1)] \times 100$.

Où A_0 et A sont les densités optiques initiales et finales densités optiques initiales et finales de la phase aqueuse, respectivement.

Les souches seront classées comme suit :

- Très hydrophobe, pour les valeurs $> 50\%$;

Modérément hydrophobe, pour des valeurs allant de 20 à 50%

- Ethydrophile, pour des valeurs $< 20\%$.

Toutes les expériences seront réalisées en triple et répétées dans deux expériences indépendantes. Les données seront analysées par test ANOVA.

XI. Evaluation de la capacité des souches à former le biofilm sur l'acier inoxydable et le verre émaillé :

➤ **Préparation des souches :**

L'expérience est menée sur un nombre (n) de souches de staphylocoques productrices de biofilm (testé auparavant).

Les souches choisies pour cette étape de l'étude sont activées par culture deux fois dans 10 ml de bouillon de soja tryptique (TSB) à 37 ° C pendant 24 h.

➤ **Production de biofilm**

Le procédé utilisé est selon (**Di Bonaventura et al. 2008**).

Des puces en acier inoxydable et en verre émaillé (530 mm²) sont utilisées pour la formation de biofilm.

Les essais sont réalisés à 12 et 37 ° C. Ces deux températures ont été choisies par leur pertinence ; pour l'industrie alimentaire (12 ° C), et dans les maladies infectieuses (37 ° C).

Matériel et méthodes

Les puces ont été dégraissées avant utilisation par immersion dans l'éthanol, puis rincé abondamment à l'eau distillée stérile et passés à l'autoclave pendant 15 min à 121 °C.

Des cultures de souches de staphylocoques ont été préparées, à partir du jour de lendemain elles ont cultivé dans le TSB et incubées à températures choisies : 12 et 37 °C. Les cultures ont été lavées trois fois avec phosphate-4 ; une solution saline tamponnée (PBS ; pH 7,3) et diluée avec des produits frais du BST à atteindre une concentration d'environ 10,8 UFC/ml en lisant le niveau de densité optique (DO) à 550 nm.

Trois millilitres (ml) de l'inoculum standardisé ont ensuite été ajoutés aux puces en acier inoxydable et en verre émaillé.

Les échantillons ont été incubés à (12 °C et à 37 °C), à 24 h, puis les cellules non adhérentes ont été éliminées par trempage (chaque échantillon trois fois dans du PBS stérile).

Les échantillons ont été fixés à 60 °C pendant 1 h et colorés avec 3 ml de 2% d'une solution de cristal violet dans 95% d'éthanol pendant 15 min. Après coloration, les échantillons ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée. Des contrôles négatifs ont subi les mêmes traitements, mais sans inoculation.

L'analyse quantitative de la production de biofilm est performée en ajoutant 3 ml de d'acide acétique à 33% qui décolore les échantillons. De 200 µl de chaque échantillon ont été transférés dans une plaque de micro titrage et le cristal violet dans la solution présente le niveau de détachage. La densité optique a été mesurée à 590 nm.

Les résultats ont été normalisés en calculant les indices de production de biofilm (BPIS) comme suit : $BPI = [OD \text{ biofilm moyenne surface (mm}^2) - 1] \times 1000$.

Deux ensembles indépendants de toutes les expériences.

XII. 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 productrice de Slim ou non, et celles du TCP et facteurs (pH, Nacala, Ethanol et H₂O₂) sont exprimées en moyenne.

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

Les Staphylocoques ont une aptitude à former des biofilms, adhérant à des surfaces très diverses (biotiques, et abiotiques). Cette capacité est considérée comme un important facteur de virulence.

Cette étude vise à déterminer le potentiel de formation de biofilm chez les staphylocoques sur différentes surfaces abiotiques (microplaque, inox et verre), en déterminant aussi l'effet du Nacala et d'autres facteurs sur la production de biofilm, (pH, H₂O₂, l'éthanol et l'influence de l'hydrophobicité de surface). L'étude de la production du Slim est réalisée par une technique qualitative du rouge Congo (RCA), et la formation du biofilm est réalisée par la technique quantitative de culture sur microplaque TCP.

Les souches utilisées dans cette étude ont été isolées à partir des prélèvements issus des infections humaines et animales ainsi que des dispositifs médicaux. Les souches ont été identifiées selon les méthodes phénotypiques et biochimiques et confirmés par la technique MALDI-TOF MS.

Afin de vérifier l'expression des gènes codant les facteurs de formation de biofilm et la relation avec les facteurs de l'environnement et les gènes régulateurs, l'opéron *icaABCD* et le gène *bap* ont fait l'objet d'une investigation moléculaire par une technique des puces à ADN (Microarray). De même les deux gènes régulateurs (*agr* et *sarA*) ont été aussi recherchés.

Sachant que la partie pratique n'a été faite à cause de crise sanitaire COVID-19, aucun Résultat relatif à l'étude de la production du slime et la formation du biofilm n'a été obtenu, nous souhaitons que ce travail sera réalisé par d'autres étudiants en utilisant un nombre élevé des souches et en testant d'autres facteurs comme la concentration du glucose et d'autres surfaces abiotiques et biotiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Achek(a), R., El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Ehricht, R., Hamdi, T.M., Azzi, O., Monecke, S. Short communication: Diversity of staphylococci isolated from sheep mastitis in northern Algeria. *J Dairy Sci* 2020; 103(1), 890-897.

Achek(b) R, Hotzel H, Nabi I, Kechida S, Mami D, Didouh N, Tomaso H, Neubauer H, Ehricht R, Monecke S, El-Adawy H. Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Sources in Algeria. *Pathogens* 2020, 9, 153; doi:10.3390/pathogens9020153.

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,

Allinet, J., Galdbart, J.O., Morvan, A., Dyke, K.G., Vaudaux, P., Aubert, S., Desplaces, N. and Elsoh, N. (1999). Tracking adhesion Factors in *staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material microbiology. 145(8), 2033-2042 .

Allison, D. G., Ruix, B., Sanjose, G., Jaspe, A and Gillebert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *pseudomonas fluorescens* biofilms FEMS, Microbial lett, 167, 179-184.

Alnasouro, M. (2010). Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. [Thèse de doctorat : Ressources Procédés Produits Environnement]. Lorraine : Université de Limoges, 161p.

Annous, B., Fratamico, P. and Smith, J. L. (2009). Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do||, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24-37.

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.

Auger, M. (2012). Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques d'*Escherichia. Coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. [Thèse de Doctorat : Biologie médicale]. Nantes : Université de Nantes ; 83p.

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

B

Baillif,S.,HartmannD., Freney,J.,Kodjikian,I.(2010).Implant intraoculaire et adhesion bacterienne :influence des conditions environnementales , des propriétés bacteriennes et des caractéristiques du matériau.Journal francais d'ophtamologie.33,210-221.

Bakhom.I., (2004). Contrôle de qualité et validation de différentes méthodes d'identification bactérienne. Université cheikh anta diep. Thèse de doctorat en pharmacie 113 p.

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

Basler, B.L. (2002).Small talk.Cell-cell communication in bacteria.Cell109: 421 -424.

Bellifa, S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de klebsella pneumoniae isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat . Université Abou bekr belkaid, Tlemcen.

Belloin C, Roux A et Svanborg C. (2008). *Escherichia coli*, biofilms Curr Top Microbiol Immunol 322,249, 289.

Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. and Van Oss, C.J. (1996). Microbial adhesion to soil Vents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. In Colloïdesand Surfaces B, Bio interfaces, pp.47-53.

Bendouah, Z. (2008). Implication des biofilms dans la rhino sinusite chronique et l'évaluation des traitements avec un modèle *in vitro*. [Mémoire de Master : Recherche clinique]. Montréal : Université de Montréal, 110p.

Berche.P., Gaillard J and Simonet M. (1988).Collection de la biologie a la clinique bactériologie « bactéries des infections humaines » Flammarion médecine sciences, paris, p267-277.

Bergeon, L. (2016). Rôle de *S. captis.*,*S. caprae.*, *S. lugdunensis* dans les infections osteo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques. Université Toulouse 3 Paul Sabatier Faculte 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: 70
- 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,
- Bougoudogo, F., Vely, F., Nato, F., Bootonnier, P., Gounon, Mazholie, J-C ., Fournier, J.M. (1995).** Immunoglobulin G on the mucosal surface to vibrio cholerae 01. Bulletin de l'institut Pasteur 9(4), 273-283.
- Bohach, G. (2008).** "Staphylococcus". In Access Science. CM&G Hill Companies.
- Boles, B.R., Horswill, A.R. (2011).** Staphylococcal biofilm disassembly. Trends in microbiology 19, 449-455.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. and Kolter, R. (2005)** Biofilms: the matrix revisited. Trends in microbiology 13, 20-26.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. and Bellon-Fontaine, M.N. (1999a).** *Wisteria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. Apple Environ Microbiol. 65, 5328-5333.
- Briandet, R., Leriche, V., Carpentier, B. and Bellon-Fontaine, M.N. (1999b).** Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Wisteria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *J Food Prot.* 62, 994-998.
- Bronner, S., Monteil, H. and Prevost, G. (2004).** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 28, 183-200.

C

- Camara, M., Williams, P., Hardman A. (2002).** Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* 2 : 667-676.
- Casey, A., Lambert, P., Elliott, T. (2007).** Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29, S23-S32.
- Charlebois, A. (2015).** Étude sur le biofilm et les mécanismes de résistance à la Bacitracine chez *Clostridium perfringens*. [Thèse de Doctorat : Microbiologie].

Montréal : Université de Montréal ; 213p.

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.

Chien, Y., Manna, A.C. and Cheung, A.L. (1998). SarA level is a determinant of agr activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*.30, 991-1001.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H. (1982). 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.

Conlon, K.M., Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2002a).*IcaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of Ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol*. 184, 4400-4408.

Cook, D.W., Ruple A.D. (1992). Cold storage and Mild Heat treatment as processing Aids to reduce the numbers of *Vibrio vulnificus* in Raw oysters. *Journal of food protection* 55(12),985-989.

Corne, P. (2004). *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : Etude génétique, phénotypique et épidémiologique. Université Montpellier. Thèse doctorat en biologie santé. 116p.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg (1999). Bacterial biofilms a common cause of persistent infections, *science* 284(5418)1318-1322.

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.

Couture B. (1990). Bactériologie médicale « Etude et méthode d'identification des bactéries aérobies et anaérobies d'intérêt médicale ». Vigos, Paris 15-32.

Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W. and Gotz, F. (1999). The intercellular adhesion (*Ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 67, 5427-5433.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 183, 2888-2896.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Paris, C., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J.R., (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 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.

De Chalvet De Rochemonteix, A. (2009). Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.

Delarras, c. (1981). Etude taxinomiques des micrococcaceae . Thèse de doctorat d'état , université de Clermont II.

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.

Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., and Ianieri A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Wisteria monocytogenes* on various food- contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1552-1561.

Di Ciccio P., Vergara A., Festino A.R., Paludi D., Zanardi E., Ghindini S., and Lamieri A. (2014). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contactsurfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity, *Food Control*. Doi : 10.1016/j.foodcont.2014.10.048.

Di Poto, A., Sbarra, M.S., Provenza, G., Visai, L., Speziale, P. (2009). The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials* 30, 3158-3166.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8, 881-890.

Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15, 167-193.

Dohin, B., Y. Gillet, R. Kohler, G. Lina, F. Vandenesch, P. Vanhems, D. Floret, and J. Etienne. (2007). Pediatric bone and joint infections caused by panton-valentine leukocidine positif *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J* 26 :1042-1048.

Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J. et Lina, G. (2002). High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus species*. *J Bacteriol.* 184, 1180-1186

Dumas C. (2007). Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

Duplay.SE., (1890). Traité de chirurgie. Tome1. G. Masson, Paris.852p.

Downer, R., Roche, F., Park, P.W., Mecham, R.P. et Foster, T.J. (2002). The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem.* 277, 243-250.

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.

F

Fasquelle, R. (1974). *Eléments de bactériologie médicale.* Flammarion.

Federigki M (2005). *Bactériologie alimentaire : Compendium d'hygiène des aliments* 2è me Ed. Economica, Paris. P29-40.

Fluckiger, U., Wolz, C. et Cheung, A.L. (1998). Characterization of a sar homolog of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 66, 2871-2878.

Fomba. (2006). Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotique des acétobacter Baumann et staphylocoque à coagulase négative à l'hôpital du point G. thèse de doctorat : Faculté de médecine, de pharmacie et d'odontostomatologie. 95.

Fournier, B. and Hooper, D.C. (2000). A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 182, 3955-3964.

Fournier, B., Klier, A. and Rapoport, G. (2001). The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 41, 247-261.

Foster, T.J. and Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 6, 484-488.

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.

Fuqua, C, Greenberg E.P., (2002). Listening in on bacteria: acyl – housekeeping lactone signaling. Nat Rev Mol Biol Cell 3: 685 -695.

G

Garrity.GM., Johnson.KL.Beb.J. and Scarfes.DB.(2002). Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Second Ed. Springer-Verlog. New-York. P165-167.

Genestier, A.L., Lina, G. (2001). Un feu d'artifice de supertigènes chez *Staphylococcus aureus*. Lettre de l'infectiologie 16, 279-283.

Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., and Gotz, F. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem. 273, 18586-18593.

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

Goller, C.C., Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development. Bacterial Biofilm, 37-66.

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

Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.-H. (2006). The genera staphylococcus and micrococcus. The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Formicetes, Cyanobacteria, 5-75.

Groicher, K.H., Ferik B.A., Fujimoto, David F., Bayles, Kenneth W. (2000). The *staphylococcus aureus* IrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. Journal of bacteriology 182 ,1795-1801.

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 in *Staphylococcus 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*. Nov., isolated from bovine nostrils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 792-796.

Hanzen, C. (2009). Propédeutique de la glande mammaire, sémiologie et diagnostic individuel et de troupeau. Liège, Belgique, Université de Liège, 5-28.

Harraghy, N., Hussain, M., Haggar, A., Chavakis, T., Sinha, B., Herrmann, M. and Flock, J.I. (2003). The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology*. 149, 2701-2717.

Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., Foster, T.J., Peters, G., Kehrel, B.E. & Herrmann, M. (2000). Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*. 96, 2149-2156.

Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F. & Gotz, F. (1996a). Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun*. 64, 277-282.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. & Gotz, F. (1996b). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*. 20, 1083-1091.

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.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. & Gotz, F. Hennekinne, J. (2009). Nouvelles approches pour la caractérisation des toxico-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive. Thèse Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'environnement, Agro Paris Tech. 183p.

Henrici A. (1932). Studies of freshwater bacteria. a direct microscopic technique, journal of bacteriology, 25.

Hou W., Sun X., Wang Z. et al., (2012), Investigative Ophthalmology & Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53): 9. 5624.5631.

Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F. and Peters, G. (1997). A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun.* 65, 519-524.

Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G. and Herrmann, M. (2001a). Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol.* 183, 6778-6786.

Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G. and Herrmann, M. (2001b). Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microbe Pathog.* 31, 261-270.

I

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

J

Ji, G., Pei, W., Zhang, L., Qiu, R., Lin, J., Benito, Y., Lina, G. and Novice, R.P. (2005). *Staphylococcus intermedius* produces a functional agr autoinducing peptide containing a cyclic lactone. *J Bacteriol.* 187, 3139-3150.

Jidar. (2007). Prévalence du staphylocoque doré résistant à la méthicilline chez les patients hospitalisés en dermatologie. Thèse de doctorat : université Paris Descartes faculté de médecine 55.

Jung, K.Y., Cha, J.D., Lee, S.H., Woo, W.H., Lim, D.S., Choi, B.K. and Kim, K.J. (2001). Involvement of staphylococcal protein A and cytoskeletal actin in *Staphylococcus aureus* invasion of cultured human oral epithelial cells. *J Med Microbiol.* 50, 35-41.

K

Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal : mechanisms , clinical implication, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research* , 89(3),205-215.

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. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, 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.
*diseases*13, 1840.

Klein, E., Smith, D.L., Laxminarayan, R. (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging infectious*

Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. and Jabbouri, S. (2006). Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin.*FEMS Microbiol Lett.* 255, 11-16.

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.

Konate, B. (2001). Micro méthode d'identification et étude de la sensibilité des Staphylocoques, Enterocoques, et Streptocoques.Intéret et application dans le diagnostic rapide des infections microbiennes. Thèse pharm. UCAD.Dakar. P3-32.

Kong, C., Chee, C.F., Richter, K., Thomas, N., Noorsaadah, A.R., Nathan, S. (2018). Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162.*Scientific reports* 8,2758

Krepsky, N., Rocha Ferreira, R.B., Ferreira Nunes, A.P., Casado Lins, U.G., Costa, e. Silva Filho F, de Mattos-Guaraldi, A.L. and Netto-dosSantos, K.R. (2003). Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol.* 46, 280-286.

Kridech, H., Ben blidia . A. (2016). Isolement et caractérisation des staphylocoques responsables des infections urinaires.

Kuchma S. L., Connolly J. P., O'toole G. A. (2005). A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1441-1454.

L

Lasa, I. and Penades, J.R. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72, 2177-2185.

Lebeau, D et Ghigo, J.M (2012). Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? *médecine/sciences*, 28 :727-39.

Lee Soomin., Choi Kyoung-Hee., Yoon Yohan. (2014). Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* Outbreak linked to Ham; in *Korean J. Food Sci.* 257; 257-261.

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. Fleurette* 2, 773-794.

Leyral, G., Vierling, E. (2007). *Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires* 4ème édition France : Editions Doin ,287p.

Liang, X., Zheng, L., Landwehr, C., Lunsford, D., Holmes, D. and Ji, Y. (2005). Global regulation of gene expression by arlrs, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 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.

Lofdahl, S., Guss, B., Uhlen, M., Philipson, L. and Lindberg, M. (1983). Gene for staphylococcal protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 697-701.

Lowy, F.D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *English Journal of Medicine.* 339: 520532.

M

Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. and Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glycosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol.* 178, 175-183.

Manna, A.C., Bayer, M.G. and Cheung, A.L. (1998). Transcriptional analysis of different promoters in the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 180, 3828-3836.

Manna, A. and Cheung, A.L. (2001). Characterization of sarR, a modulator of SAR expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 69, 885-896.

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. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4592-4601.

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., 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 (1):25-9.

McCrea, K.W., Hartford, O., Davis, S., Eidhin, D.N., Lina, G., Speziale, P., Foster, T.J. and Hook, M. (2000). The serine-aspartate repeats (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* 146 (Pt 7), 1535-1546.

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.

Merani ZA., Fatima A., Urooj Sh., Aziz M., MN Khan. Abbas, T. (2018). - Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iran J Basic Med Sci.* 21, 760-769.

Miyazaki, E., Chen, J.M., KO, C. and Bishai, W.R. (1999). The *Staphylococcus aureus* gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J Bacteriol.* 181, 2846-2851.

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.

Morot-Bizot, S.C. (2006). Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II,

N

Navarre, W.W. and Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63, 174-229.

Nagaveni S., Rajeshwari H., Ajay Kumar Oli., Patil S.A., and Kelmani Chandrakanth R. (2010). Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Bioscan*; 5(4) : 563-566.

Novick, R.P. and Muir, T.W. (1999). Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2, 40-45.

Novick, R.P. and Jiang, D. (2003). The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology.* 149, 2709-2717.

O

Ogston.A. (1882). Micrococcus poisoning. *JAnat.*17(1); P 24-58.

Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y.M., Suginaka, H. and Tomasz, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an Endo-Beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 285-289.

Othmani, A. (2014). Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à sa surface. [Thèse de doctorat : Ecologie Chimique Marine]. Toulon : Université de Toulon ; 273p.

Otto, M., Sussmuth, R., Jung, G. and Gotz, F. (1998).Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system.*FEBS Lett.* 424, 89-94.

Otto, M., Sussmuth, R., Vuong, C., Jung, G. and Gotz, F. (1999).Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis* agr pheromone and derivatives.*FEBS Lett.* 450, 257-262.

Otto, M. (2004).Quorum-sensing control in Staphylococci -- a target for antimicrobial drug therapy.*FEMS Microbiol Lett.* 241, 135-141.

P

Park, P.W., Rosenbloom, J., Abrams, W.R., Rosenbloom, J. and Mecham, R.P. (1996).Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (EbpS) in *Staphylococcus aureus*.*J Biol Chem.* 271, 15803-15809.

Park, P.W., Broekelmann, T.J., Mecham, B.R. and Mecham, R.P. (1999).Characterization of the elastin binding domain in the cell-surface 25-kDa elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS).*J Biol Chem.* 274, 2845-2850

Pasteur.L., (1877). A propos de deux maladies soignées à l'hôpital Saint-Louis pour, pustule maligne.

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.

Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. and Gotz, F. (2000). The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 2845-2847.

Peters, G., Locci, R. and Pulverer, G. (1982).Adherence and growth of coagulase-negative.

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

Phillips PL., Wolcott RD., Fletcher J. and Schultz GS, (2011). Biofilms made easy, *Wound International*, 1 (3).

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. and Nair, S.P. (2001).*Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes Infect.* 3, 633-637.

Puja Neopane., Hari Prasad Nepal., Rjeet Shrestha., Osamu Uehara., Yoshihiro Abiko. (2018). In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance:in International Journal of General Medicine; 11:25-32.

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. and Ziebuhr, W. (2000a). Alternative transcription factor sigma (B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol.* 182, 6824-6826.

Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J. and Ziebuhr, W. (2000b).Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*.*Antimicrob Agents Chemother.* 44, 3357-3363.

Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. and Novick, R.P. (1986).Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar.*Mol GenGenet.* 202, 58-61.

Rhechidi _ sidhoum N., Brugère –piscoux J. (1992). Manuel de pathologie aviaire. Edition Tec&Doc, Lavoisier, Paris.

Reifsteck, F., Wee, S. and Wilkinson, B.J. (1987). Hydrophobicity-hydrophilicity of staphylococci.*J Med Microbiol.* 24, 65-73.

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

Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013). *Staphylococcus aureus* and Pseudomonas aeruginosa- Biofilm formation Methods. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.

Roux A. Et Chigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens. Communication, Bull. Acad.Vêt, 261-268.
Rice.P.LongdenI.Bleas.BA. (2007). Europeans biology molecular trend Janet suite

Robert M.Q. Shanks., Jennifer L. Sarget., Raquel M. Martinez., Martha L. Graber., George A. Toole. (2006). Catheter lock solutions influence staphylococcal biofilm formation on abiotic surfaces –Nephrol Dial transplant, Oxford University Press; 21:2247-2255.

Roche, F.M., Meehan, M. and Foster, T.J. (2003). The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology*. 149, 2759-2767.

Roux. A., Ghigo. J.M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bull. Acad. Vét.*, 159(3) : 261-268. Ngden l

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

Schaechter M., Medoff.G. Eisenstein.B.I.(1999). Microbiologie et pathologie infectieuse : Departement de Boeck université, Paris, Bruxelles, p197.

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.

Shenkman , B., Rubinstien ,E.G., cheung , A.L., Brill,G.E., Dardick, R.,Tamarin, I.,Savion, N.and varon, D.(2001).Adherence properties of *staphylococcus aureus* under static and flow conditions : role s of agr and sar loci, blatelets and plasma ligands .*Infect immune* .69,4473-4478.

Shirtliff, M.E., Mader, J.T. and Camper, A.K. (2002).Molecular interactions in biofilms.*Chem Biol*. 9, 859-871

Shivaprassad.H.L.(2016). Manueldepathologieavaire. EditionTec&Doc, LavoisierParis.

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

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.

Sonohara, R., Muramatsu, N., Ohshima, H. and Kondo, T. (1995). Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. *Biophys Chem.* 55, 273-277.

Spiers A. J., Bohannon J., Gehrig S. M., Rainey P. B. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular microbiology*, 50(1), 15-27.

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

Spormann A. M. (2008). Physiology of microbes in biofilms. In *Bacterial Biofilms* (pp. 17-36). Springer Berlin Heidelberg

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., Djukic, S., cirkovic, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing

Stoodly P, Sauer K, Davies D.G, Costerton J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of microbiology* 56 :187 – 209.

Stepan.J., Pantucek.R., Doskar.F. (2004). Molecular diagnostic of clinically important staphylococci. *Folia Microbiol*: 49(4). P353-356.

Sun, D., Accavitti, M.A. and Bryers, J.D. (2005). Inhibition of Biofilm Formation by Monoclonal Antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A Accumulation-Associated Protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12, 93-100.

Spiers A. J., Bohannon J., Gehrig S. M., Rainey P. B. (2003). Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular microbiology*, 50(1), 15-27.

T

Talaro, Kathleen, Park.(2008). *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York

Takahashi, J., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Nishida, T., Labischinski, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Yamagishi, J. and Sugai, M. (2002). Molecular characterization of an *atl* null mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 46, 601-612.

Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Debarbouille, M., Penades, J.R. and Lasa, I. (2005). *Staphylococcus aureus* develops an Alternative, ica-Independent Biofilm in the Absence of the arlRS Two-Component System. *J Bacteriol.* 187, 5318-5329.

Touti, A., Achour, W., Abbassi, M., -S, Ben Hassen.A. (2007). Detection of ica genes and slime production in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from catheter related infections in neutropenic patients.in *Pathologie Biologie.* 55,277-282.

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

U

Uhlen, M., Guss, B., Nilsson.B., Gatenbeck.S., Philipson.L.and Lindberg.M.(1984). Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol Chem.*259,1695-1702.

V

van der Borden, A.J., van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (2004). Electric-current-induced detachment of *Staphylococcus epidermidis* strains from surgical stainless steel. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 68, 160-164

Van Schaik, W. and Abee, T. (2005). The role of sigma (B) in the stress response of Gram-positive bacteria - targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol.* 16, 218-224.

Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Li, J. and Jabbouri, S. (2006). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain.*Carbohydrate Res.* 341, 738-743.

Vu B., Chen M., Crawford R. J., Ivanova E. P. 2009. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation||, *Molecules*, and Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.

W

Vuong, C., Saenz, H.L., Gotz, F. and Otto, M. (2000).Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*.*J Infect Dis.* 182, 1688-1693.

Vuong, C. and Otto, M. (2002).*Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 4, 481-489.

Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R. and Otto, M. (2003). Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 188, 706-718

W

Waters, C.M, Basler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell – to- cell communication in bacteria. *Annul Rev Cell Dev Biol* 21 :319 -346.

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.

Wrangstadh, M., Conway, P.L. and Kjelleberg, S. (1986). The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. *Arch Microbiol.* 145, 220-227

X

Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M. and Gao, Q. (2006). Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 74, 488-496.

Y

Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* 78:110-116.

Yarwood, J.M. and Schlievert, P.M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* 112, 1620-1625.

Z

Ziebandt, A.K., Becher, D., Ohlsen, K., Hacker, J., Hecker, M. and Engelmann, S. (2004). The influence of agr and sigmaB in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics.* 4, 3034-3047.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E. and Hacker, J. (1997). Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun.* 65, 890-896.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F. and 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. *Mol Microbiol.* 32, 345-356.

Zobel, C.E. (1943). The effect of solid surface upon bacteria activity. *Journal of bacteriology.* 46 :39-56.

Annexes

Annexes :

1.Milieux de culture :

Gélose de Baird Parker :

Composition :

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

pH 6,8 ± 0,3

Milieu de Chapman :

Composition :

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcin)	01g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin)	10g
Chlorure de sodium.....	05g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

PH=7,6

Préparation : 111g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

Rouge Congo Agar:

Annexes

Composition:

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

Gélose nutritive :

Composition :

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

pH =6,8-7,4

Gélose au sang cuit :

Composition : en grammes par litre d'eau distillée

Mélange spécial de peptones.....	23g
Amidon.....	01g
NaCl.....	05g
Agar.....	10g
Sang de mouton.....	50ml

Ph finale :7,3

BouillonBHIB :

Composition :

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5.0g

Annexes

Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0g
Chlorure de sodium.....	2.0g
Phosphate disidique.....	5.0g
Eau distillé.....	1L

pH= 7.4

Bouillon tryptone soja (TSB) :

Composition :

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 nutritif

Composition :

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.

Le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) à 0,1M, pH= 7,2± 2 :

Composition:

KH ₂ PO ₄	0, 29 g
---------------------------------------	---------

Annexes

K₂HPO₄ 1, 19 g

Na Cl4, 93 g

Dans un litre d'eau distillée. Eau distillée (qsp) 1 L

Cristal Violet :

Composition :

Cristal violet..... 2g

Eau distillée..... 100ml

2.Les techniques :

Technique de MALDI-TOF MS :

Principe :

Le principe général du MALDI-TOF-MS 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 en 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). Plusieurs techniques de dépôt existent ;

- Les préparations en <<couches minces>> : l'échantillon est déposé sur une couche de matrice préalablement déposée sur la plaque cible pour former de large films minces poly cristallins.
- Les préparations en <<gouttes épaisses>> ou<<gouttes sèches>> : la matrice et l'échantillon sont mélangés soit dans un tube puis déposés sur la plaque cible, soit directement sur la plaque cible.
- Les préparations en <<sandwich>> : l'échantillon est déposé sur un film de matrice avant d'être lui-même recouvert par une dernière couche de matrice.

Une fois les échantillons déposés sur la cible, cette dernière est introduite dans le spectromètre de masse. Chaque dépôt est soumis à l'action du rayon laser UV. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui provoque la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes (**Carmontelle. Etienne et al.,2011**).

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 µl d'eau distillée stérile. Après addition de 900 µl d'éthanol (96%), l'identification des espèces a été effectuée selon un protocole décrit par (El-Asker et al., 2015).

Brièvement, Après centrifugation pendant 5 minutes à 10 000 pm, le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans 50 µl d'acide formique à 70% (vol / vol) (Sigma-Aldrich, Allemagne). Ensuite, 50 µl d'acétonurie ont été ajoutés, mélangés et centrifugés pendant 5 minutes à 10 000 pm. Le surnageant était transféré dans un nouveau tube, 1,5 ml du surnageant a été spot sur une plaque cible MTP 384 polistes TF (BrukerDaltonikGmbH, Brême, Allemagne), et séché à l'air. L'extrait séché a été recouvert de 2 µl d'une solution saturée en acide α -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).

Technique de puces à ADN :

Les puces à ADN sont des multiplicateurs permettant de caractériser et quantifier un acide nucléique dans un échantillon. Elles apportent une solution innovante au problème ancien de la détection, de l'identification, et du typage de bactéries dans un échantillon. Elles permettent la caractérisation génomique rapide de bactéries pathogènes (GlaserPhilippe.,2005).