

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université « Dr. Moulay Tahar » de Saida

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire présenté en vue de l'obtention

Du diplôme de Master en : Biologie

Option: Microbiologie

Par

Hadji Bouchra Kabouche Ghania

Etude de l'effet du pH et du temps d'incubation sur la
Formation du biofilm à *Staphylococcus aureus*.

Soutenu devant le jury composé de :

Président	Seghir A	MCB	Université de Saida
Examineur	Benreguig M	MCA	Université de Saida
Promoteur	Ghellai L	MCB	Université de Saida

2017-2018

Remerciements

*Avant tout, nous remercions notre créateur « **Allah** » tout puissant qui nous avoir, donné la force, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail et arriver à ce stade scientifique.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mr Ghellai Lotfi**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre **préparation de ce mémoire.***

Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par :

*Monsieur le Président du jury **Seghir A** pour avoir accepté de présider notre jury et consacré de son temps à la lecture de notre mémoire pour y apporter les meilleurs perfectionnements.*

*A Mr **Benreguig M** pour sa contribution à l'examination de ce travail*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs et enseignants du **département de Biologie** de l'université Dr Moulay Tahar Saida , pour nous avoir permis d'acquérir toutes ces connaissances durant les cinq ans de notre formation.*

***Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à toutes
Les personnes qui auront contribué de près ou
De loin à l'élaboration de ce mémoire.
Merci à toutes et à tous.***

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو اختبار قدرة سلالتين من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* (LMB20327) و (LMB20330) لإنتاج البيوفيلم في أوساط ذات رقم هيدروجيني مختلف (5، 7 و 9) و أثناء فترات مختلفة من الحضانة (24، 48 و 72 ساعة). وفي الوقت نفسه، استخدمنا سلالتين مرجعيتين من المكورات العنقودية Sa113 ATCC35556 (منتجة للبيوفيلم) و 'Ica' (غير قادرة على إنتاج البيوفيلم) لأغراض المقارنة. من أجل اكتشاف إنتاج البيوفيلم قمنا بتطبيق طريقة الأنايب (TM). يبدو أن الأس الهيدروجيني للوسط له تأثير على تشكيل البيوفيلم؛ كلما كان الرقم الهيدروجيني أعلى، كلما كان مستوى البيوفيلم أكثر أهمية. بعد 48 ساعة من الحضانة، كمية البيوفيلم المنتجة كانت مرتين بالنسبة إلى تلك المتحصل عليها بعد 24 ساعة. هذه الكمية لم تتغير بعد 72 ساعة من الحضانة. مع العلم أن طريقة 'TM' المستخدمة في هذه الدراسة تؤدي في بعض الأحيان إلى نتائج غير مستقرة، فإن تأثير درجة الحموضة و مدة الحضانة على تشكيل البيوفيلم بواسطة المكورات العنقودية يظل غامضاً.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus*، وقت الحضانة، الرقم الهيدروجيني، البيوفيلم

Résumé

L'objectif de cette étude était de tester la capacité de deux souches cliniques de *Staphylococcus aureus* (LMB20327 et LMB20330) à produire le biofilm à différentes valeurs de pH (5, 7 et 9) et pendant différents temps d'incubation (24h, 48h et 72h). Parallèlement, deux souches de référence de *S. aureus*, Sa113 ATCC35556 (biofilm positif) et Ica (biofilm négatif) ont été utilisées à des fins de comparaison. Afin de détecter la production de biofilm nous avons appliqué la méthode en tubes (TM). Le pH du milieu semble avoir un effet sur la formation de biofilm ; plus le pH augmente plus le taux du biofilm est important. Après 48h d'incubation, la quantité de biofilm produite est environ deux fois supérieure que celle obtenue après 24h. Néanmoins, cette quantité reste stable après 72h d'incubation. Sachant que la méthode TM utilisée dans cette étude aboutit parfois à des résultats fluctuants et instables, l'effet du pH et du temps d'incubation sur la formation de biofilm à *S. aureus* reste contestable.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, biofilm, pH, temps d'incubation

Summary

The objective of this study was to test the ability of two clinical strains of *Staphylococcus aureus* (LMB20327 and LMB20330) to produce biofilm at different pH values (5, 7 and 9) and for different incubation durations (24h, 48h and 72h). In the same time, two reference strains of *S. aureus*, Sa113 ATCC35556 (biofilm positive) and Ica (biofilm negative) were used for comparison. In order to detect biofilm production we applied the tube method (TM). The pH of the medium appears to have an effect on biofilm formation; when the pH increase, the biofilm rate is more important. After incubation duration of 48 hours, the amount of biofilm produced is approximately twice that those obtained after 24 hours. This quantity remains stable after 72 hours of incubation. Knowing that the TM method used in this study has sometimes fluctuant and unstable results, the effect of pH and incubation duration on *S. aureus* biofilm remains contestable. **Keywords:** *Staphylococcus aureus*, biofilm, pH, incubation time.

Table des matières

Introduction	1
--------------------	---

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre I. *Staphylococcus aureus*

1. Historique.....	2
2. Description microbiologique.....	2
3. Taxonomie.....	3
4. Caractères physiologiques.....	4
5. Caractères culturels.....	5
6. Pouvoir pathogène.....	5
6.1. Constituants de l'enveloppe.....	6
6.2. Composants de surface.....	7
6.3. Composants sécrétés.....	8
6.3.1. Exoenzymes et protéines.....	8
6.3.2. Toxines.....	10
7. Facteurs de persistance.....	13
8. Régulation des facteurs de virulence.....	14
9. Facteurs de virulence et spécificité d'hôte.....	15
10. Mécanisme de résistance.....	16
11. Epidémiologie	18

Chapitre II : Généralités sur les biofilms bactériens

1. Historique.....	20
2. Définition.....	21
3. Formation du biofilm chez <i>S. aureus</i>	22
3.1. Adhésion réversible.....	24
3.2. Adhésion irréversible.....	26
3.3. Formation de micro-colonies.....	27
3.4. Maturation	28
3.5. Dispersion.....	29
4. Structure et composition du biofilm.....	29
4.1. Différentes formes d'un biofilm.....	29
4.2. Diversité des biofilms.....	31

4.3. Composition du biofilm chez <i>S. aureus</i>	32
5. Facteurs influençant la formation d'un biofilm.....	35
5.1. Caractéristiques de la surface.....	35
5.2. Rugosité de la surface.....	36
5.3. Propriétés physicochimiques de la surface.....	37
5.4. Influence des conditions environnementales.....	39
5.5. Présence de films protéiques sur la surface	40
5.6. Propriété des cellules	40
6. Régulation de la formation de biofilm.....	41
6.1. Quorum Sensing	41
6.2. Les molécules du quorum sensing.....	42
6.3. Rôles du quorum sensing.....	42
6.4. Altération du quorum sensing.....	42
7. Les biofilms dans le domaine médical.....	43

Partie II. Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude	46
2. Matériel biologique.....	46
2.1 Souches bactériennes.....	46
2.2. Revivification des souches.....	46
2.3. Tests préliminaires d'identification.....	46
2.3.1. Caractères macroscopiques.....	47
2.3.2. Caractères microscopiques.....	47
2.3.2.1. Examen à l'état frais.....	47
2.3.2.2. Examen à l'état coloré (Coloration de Gram).....	47
2.3.3. Autres caractères	
2.3.3.1. Recherche de la catalase.....	48
2.3.3.2. Test coagulase.....	48
2.3.3.3. Test oxydase.....	48
2.3.3.4. Test Pastorex.....	49
2.4. Conservation des souches.....	49
3. Techniques d'évaluation de la formation de biofilm in vitro.....	49
3.1. La méthodes de tubes (TM).....	50

3.2. Effet de pH sur la formation de biofilm chez <i>S. aureus</i>	50
3.3. Effet de temps d'incubation sur la formation de biofilm chez <i>S. aureus</i>	50

Partie III. Résultats et Discussion

1. Résultats de l'identification préliminaire.....	52
1.1. Caractères macroscopiques.....	52
1.2. Caractères microscopiques.....	53
1.3. Test catalase.....	54
1.4. Test oxydase.....	55
1.5. Test de coagulase libre.....	55
1.6. Test Pastorex ou d'agglutination.....	56
2. Effet du pH sur la formation des biofilms chez <i>S. aureus</i>	56
3. Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez <i>S. aureus</i>	59
Conclusion	61
Références.....	62
Annexes	

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
ARN	Acide Ribo Nucléique
ARNr	Acide Ribo Nucléique ribosomal
SCP	les staphylocoques à coagulase positive
SCN	les staphylocoques à coagulase Négative
SSSS	Staphylococcal Scaled Skin Syndrome,
TSS	Toxic Shock Syndrome “
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la Méthicilline
Clfa	Protéine de liaison au fibrinogène
FnBP	Protéine de liaison à la fibronectin
EbpS	Protéine de liaison à l'élastine
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEA	Entérotoxines Staphylococciques A
Spa	Protéine de surface A
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
VISA	Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistants à la Vancomycine
SCC	Staphylococcal Chromosomal Cassette
Agr	Accessory gene regulator
EPS	exopolysaccharide
MSSA	<i>S.aureus</i> sensible à la méticilline
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
MLS	Les Macrolides, Lincosamides et Streptogramines
GISA	<i>S. aureus</i> intermédiaire aux glycopeptides
Ica	Intercellular adhesion locus
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin

Liste des figures

Figure 1	Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique (X 20000).....	3
Figure 2	processus de diffusion de <i>S.aureus</i>	12
Figure 3	Expression des facteurs de virulence et de persistance selon la croissance bactérienne et l'expression consécutive d'agr (accessory gène régulateur)...	13
Figure 4	La prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> entre 2005 et 2012 dans le monde.....	18
Figure 5	Images obtenues par microscopie électronique de cellules de <i>S. aureus</i> adhérentes et Formant des biofilms chez l'hôte sur une valve cardiaque....	22
Figure 6	Cycle de développement simplifié d'un biofilm.....	23
Figure 7	compositions de biofilm.....	24
Figure 8	Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu de chapman.....	50
Figure 9	Observation microscopique de la souche A2 après coloration de Gram Grossissement x100.....	51
Figure 10	Observation microscopique de la souche A1 après coloration de Gram. Grossissement x100.....	51
Figure 11	Observation microscopique de la souche Sa113 après coloration de Gram. Grossissement x100.....	52
Figure 12	Observation microscopique de la souche Ica après coloration de Gram. Grossissement x100.....	52
Figure 13	Test de catalase chez les souches A1 et Sa113.....	52
Figure 14	Test de l'oxydase : résultat négatif.....	53
Figures 15	Test de coagulase : résultat positif.....	53
Figure 16	Test Pastorex 'Staph-Plus latex agglutination.....	54
Figure 17	Effet du pH sur la formation de biofilm chez les souches LMB20327 (A1), Sa113 Et Ica.....	55
Figure 18	Effet du pH sur la formation de biofilm chez les souches LMB20330 (A2), Sa113 et Ica.....	55
Figure 19	Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez les souches LMB20327 (A1), Sa113 et Ica.....	57
Figure 20	Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez les souches LMB20330 (A2), Sa113 et Ica.....	57

Liste des figures

Figure 1	Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique (X 20000).....	3
Figure 2	processus de diffusion de <i>S.aureus</i>	12
Figure 3	Expression des facteurs de virulence et de persistance selon la croissance bactérienne et l'expression consécutive d'agr (accessory gène régulateur)...	13
Figure 4	La prévalence du portage nasal de <i>S. aureus</i> entre 2005 et 2012 dans le monde.....	18
Figure 5	Images obtenues par microscopie électronique de cellules de <i>S. aureus</i> adhérentes et Formant des biofilms chez l'hôte sur une valve cardiaque....	22
Figure 6	Cycle de développement simplifié d'un biofilm.....	23
Figure 7	compositions de biofilm.....	24
Figure 8	Aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu de chapman.....	50
Figure 9	Observation microscopique de la souche A2 après coloration de Gram Grossissement x100.....	51
Figure 10	Observation microscopique de la souche A1 après coloration de Gram. Grossissement x100.....	51
Figure 11	Observation microscopique de la souche Sa113 après coloration de Gram. Grossissement x100.....	52
Figure 12	Observation microscopique de la souche Ica après coloration de Gram. Grossissement x100.....	52
Figure 13	Test de catalase chez les souches A1 et Sa113.....	52
Figure 14	Test de l'oxydase : résultat négatif.....	53
Figures 15	Test de coagulase : résultat positif.....	53
Figure 16	Test Pastorex 'Staph-Plus latex agglutination.....	54
Figure 17	Effet du pH sur la formation de biofilm chez les souches LMB20327 (A1), Sa113 Et Ica.....	55
Figure 18	Effet du pH sur la formation de biofilm chez les souches LMB20330 (A2), Sa113 et Ica.....	55
Figure 19	Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez les souches LMB20327 (A1), Sa113 et Ica.....	57
Figure 20	Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez les souches LMB20330 (A2), Sa113 et Ica.....	57

Liste des tableaux

Tableau I	Les espèces constituant le genre <i>Staphylococcus</i>	4
Tableau II	Protéines de surface (MSCRAMM) chez <i>S. aureus</i>	7

INTRODUCTION



Introduction

Les staphylocoques sont l'un des groupes bactérien les plus abondants sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux et constituent l'essentiel de la flore résidente. Les staphylocoques s'adaptent facilement aux différents biotopes ils sont observés d'une part en fonction des espèces hôtes et d'autre part, en fonction des différents gîtes ou habitats sur un même hôte ; certain espèces sont rencontrées chez l'homme, d'autres chez l'animal, certaines espèces en situation mixte présentent souvent des variations phénotypiques selon leur origine **(Devriese, 1984)**.

Parmi les staphylocoques, *Staphylococcus aureus* représente l'espèce majeure intervenant dans certains types d'infections. De plus, ce germe a une énorme capacité de survie dans des conditions peu favorables, il peut s'adhérer aux surfaces biotiques et abiotiques et former une communauté de microorganismes bien structurée et organisée que l'on appelle biofilm.

Le mécanisme de la formation de biofilm est un phénomène très complexe dont plusieurs facteurs y interviennent. Ces facteurs sont nombreux, parmi les quels on peut citer la surface à coloniser, le milieu environnant, les paramètres physicochimiques et les microorganismes **(Brangeret *al.*, 2007)**.

C'est dans cet axe que s'inscrit cette étude qui vise à tester la capacité de deux souches cliniques de *Staphylococcus aureus* (LMB20327 et LMB20330) à produire le biofilm à différentes valeurs de pH (acide, neutre et basique) et pendant différents temps d'incubation (24h, 48h et 72h).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre I : *Staphylococcus aureus*

1. Historique

Les staphylocoques ont d'abord été observés dans les lésions pyogéniques humaines par Von. Recklinghausen en 1871. Pasteur en 1880 obtient des cultures liquides de cocci à partir de pus et produit des abcès en les inoculant à des lapins. Mais c'était Alexander Ogston, un chirurgien écossais en 1880 qui a établi de manière concluante le rôle causal de coccus dans les abcès et autres lésions suppuratives. Il a également donné le nom *Staphylococcus* (*Staphyle*, en grec signifiant «grappe de raisin»: *Kokkos*, signifiant baie) en raison de la forme typique des cocci en grappes de raisin lors des observations microscopiques. La plupart des souches staphylococciques provenant de lésions pyogènes forment des colonies jaunes d'or tandis que celles provenant de la peau normale, forment des colonies blanches sur milieu gélosé ;n en 1884, Rosenbach les a nommés *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus albus* respectivement. Plus tard, *S.albus* a été renommé *Staphylococcus epidermidis* [(Murray et al., 2003) ; (Humphreys, 2002)].

Initialement, les staphylocoques furent classés au sein du genre *Micrococcus*. Dans les années 1900, les premières classifications bactériennes officielles distinguèrent les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* tout en les regroupant au sein de la famille des Micrococcaceae (Duclos et al., 1986).

Plus récemment, les données de phylogénie moléculaire associées à des analyses chimiques de ces deux genres ont conduit à la création de la famille des Staphylococcaceae à laquelle appartient *S. aureus* [(Almeida et al., 1993) ; (Devriese et al., 1984)].

2. Description microbiologique

Les membres du genre *Staphylococcus* sont des coques à Gram positif de 0,5 à 1,5 de diamètre groupés en amas irréguliers ou (Baldellon et al., 1985) (Figure 01). Ils sont immobiles, non sporulés. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après plusieurs cultures (Anathanarayan, 2002).

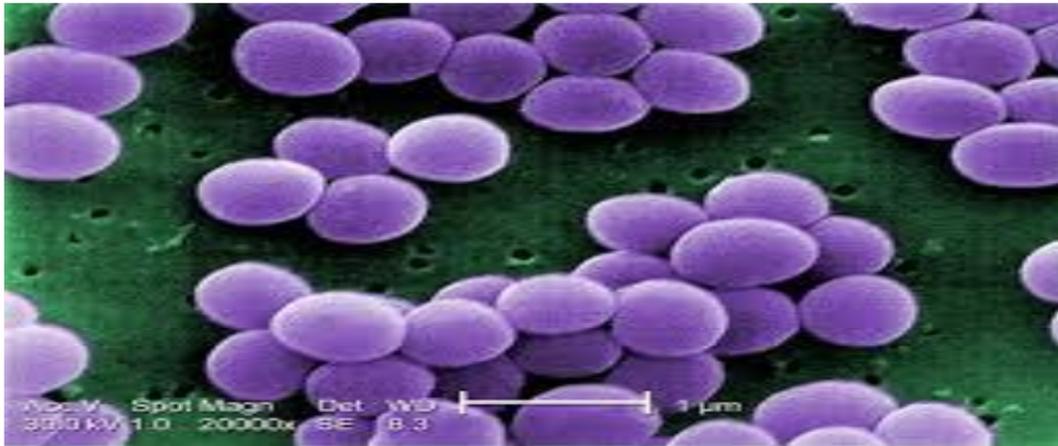


Figure 1: Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)
(Anonyme1)

3. Taxonomie

La taxonomie du genre *Staphylococcus* a subi plusieurs remaniements successifs grâce au développement du séquençage d'ARNr 16S. Sur la base d'études génomiques comparatives, le genre *Staphylococcus* est étroitement lié aux bacilles et autres bactéries à Gram positif à faible teneur en G+C (Götz *et al.*, 2006).

Le genre *Staphylococcus* regroupe 35 espèces (44 espèces et sous-espèces) (tableau 1), définies selon les critères reconnus par l'ensemble des taxonomistes - pourcentages de réassociation ADN/ADN, stabilité des hybrides et caractères phénotypiques distinctifs [(Branger *et al.*, 2007) ; (Donlan, 2002)].

La présence d'une coagulase a notamment permis de séparer le genre *Staphylococcus* en deux groupes: les staphylocoques à coagulase positive (SCP) et les staphylocoques à coagulase négative (SCN). [(Garcia, 2004) ; (Diekema *et al.*, 1997)].

Tableau 1. Les espèces constituant le genre *Staphylococcus* (Garrity *et al.*, 2002).

<i>S. arlettae</i>	<i>S. intermedius</i> *
<i>S. aureus</i> subspecies <i>aureus</i> *	<i>S. kloosii</i>
<i>S. aureus</i> subspecies <i>anerobius</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. auricularis</i> *	<i>S. lugdunensis</i> *
<i>S. capitis</i> subspecies <i>capitis</i> *	<i>S. lutrae</i>
<i>S. capitis</i> subspecies <i>urelyticus</i>	<i>S. muscae</i>
<i>S. caprae</i> *	<i>S. pasteurii</i> *
<i>S. carnosus</i> subspecies <i>carnosus</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. carnosus</i> subspecies <i>utilis</i>	<i>S. pulvereri</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. saccharolyticus</i> *
<i>S. cohnii</i> subspecies <i>cohnii</i> *	<i>S. saprophyticus</i> subspecies <i>saprophyticus</i> *
<i>S. cohnii</i> subspecies <i>urealyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i> subspecies <i>bovis</i>
<i>S. condimenti</i>	<i>S. schleiferi</i> .subspecies <i>schleiferi</i> *
<i>S. delphini</i>	<i>S. schleiferi</i> subspecies <i>coagulans</i>
<i>S. epidermidis</i> *	<i>S. sciuri</i> subspecies <i>sciuri</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. sciuri</i> subspecies <i>carnaticus</i>
<i>S. felis</i>	<i>S. sciuri</i> subspecies <i>rodentium</i>
<i>S. fleurettii</i>	<i>S. simulans</i> *
<i>S. gallinarum</i>	<i>S. succinus</i>
<i>S. haemolyticus</i> *	<i>S. vitulinus</i>
<i>S. hominis</i> subspecies <i>hominis</i> *	<i>S. xylosus</i> *
<i>S. hominis</i> subspecies <i>novobiosepticus</i>	<i>S. warneri</i> *
<i>S. hyicus</i> subspecies <i>hyicus</i>	

*espèces retrouvées chez l'homme.

4. Caractères physiologiques

S. aureus possède un métabolisme aérobie facultatif, il est caractérisé par sa capacité à produire une catalase et à fermenter le glucose qui produit de l'acide mais pas de gaz, ainsi que par l'absence de production d'oxydase.

Le mannitol est fermenté anaérobiquement seulement par *S. aureus*. Ils sont positifs à l'uréase. Ils réduisent les nitrates en nitrites, liquéfient la gélatine et sont MR, VP positif mais indole négatif. Ils sont lipolytiques lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu contenant du jaune d'œuf. Ils produisent de la phosphatase qui peut être démontrée en cultivant de l'agar nutritif contenant de la phénolphtaléine diphosphate [(Bohme *et al.*, 1996) ; (Nandy *et al.*, 2013)].

Dans un milieu contenant du tellurite de potassium, la tellurite est réduite et le noir des colonies sont produites [(Humphreys, 2002) ; (Anathanarayan, 2002)]. Le diagnostic permettant de distinguer *S. aureus* des autres espèces est basé sur des tests réalisés sur

Colonies tels que l'identification du facteur agglomérant, de la coagulase, des hémolysines et de la désoxyribonucléase thermostable ou thermonucléase **(Brown, 2005)**.

S. aureus présente un caractère halophile ainsi que la capacité à fermenter le mannitol. *S. aureus* se développe entre 10 et 42°C avec une température optimale de 37°C et un pH compris entre 7,4 et 7,6 **(Nandy et al., 2013)**.

5. Caractères cultureux

Les staphylocoques poussent aisément sur les milieux de culture usuels, dans une plage de température de 10-42 ° C à une température optimale de 37 °, et pH optimum de 7,4-7,6, donnant un trouble uniforme en milieux liquides et sur gélose, des colonies pigmentées rondes, blanches ou dorées, lisses et opaques, atteignant 1 à 3 mm de diamètre, et translucides et hémolytiques sur la gélose au sang de routine **(Bannerman et al., 2007)**.

S. aureus est une bactérie non-exigeante. En effet, en plus d'être aéroanaérobie facultative, elle est facilement cultivable en milieu gélosé classique tel que CBA (Columbia Blood Agar), TSA (Tryptic Soy Agar) ou BHI (Brain Heart infusion), ainsi que dans les milieux liquides correspondants **[(Foster, 1996) ; (Vitko et al., 2013)]**.

La gélose Chapman peut être utilisée comme milieu sélectif différentiel pour l'identification de *S. aureus*. Sur ce milieu les colonies peuvent être observées après 24h d'incubation. Elles sont opaques, de pigmentation jaune-doré, ont un aspect circulaire de 2 à 3 millimètres de diamètre ainsi qu'une surface convexe lisse et brillante.

6. Pouvoir pathogène

S. aureus, est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve fréquemment sur la peau et les muqueuses de l'Homme. C'est l'un des principaux agents étiologiques des infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que des syndromes liés à l'action des toxines **(Hanna et al., 2013)**. *S. aureus* est l'espèce de staphylocoque la plus pathogène aussi bien chez l'homme que chez les animaux **(Sutra et al., 1998)**. *S. aureus* n'est pas seulement connu pour être à l'origine d'infections purulentes comme l'infection des blessures, Il est aussi le principal responsable connu des intoxications alimentaires. Ces dernières années, de nouvelles maladies occasionnées par cet organisme ont été reconnues, comme la Dermatite exfoliative (Staphylococcal Scaled Skin Syndrome, "SSSS") chez le nouveau-né et l'enfant ou le Syndrome de choc toxique (Toxic Shock Syndrome "TSS"). Avec l'émergence de *Staphylococcus aureus* résistants à la Méthicilline (MRSA) l'organisme est d'une importance

considérable comme principal responsable des infections hospitalières, occasionnant de graves septicémies ou entérites chez les patients immunodéprimés ou opérés (Sutra *et al.*, 1998).

6.1 Les constituants de l'enveloppe

➤ La capsule polysaccharidique

La capsule a un rôle de facteur de virulence car elle empêche *in vitro* les neutrophiles de la recouvrir lors du phénomène d'opsonisation. La capsule possède des exopolysaccharides qui peuvent constituer un biofilm. Ce biofilm va enduire les bactéries et former une couche résistante aux globules blancs. 90 % des souches cliniques ont des polysaccharides capsulaires. Des chercheurs ont découvert chez l'animal une augmentation de la virulence des sérotypes 5 et 8 de *S. aureus* liée à la capsule (Thakker *et al.*, 1998).

➤ Le peptidoglycane

Ce composant de la paroi bactérienne permet la liaison (de façon covalente) de plusieurs protéines de surface et ce sont ces dernières qui vont permettre d'adhérer à la surface des cellules à infecter. Les protéines de surfaces associées au peptidoglycane sont regroupées sous le nom de MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Le peptidoglycane est immunogène et mitogène [(Riber *et al.*, 1990) ; (Grosv *et al.*, 1978)] ; Il a une activité chimiotactique sur les neutrophiles en stimulant l'activation de la cascade du complément (Verbrught *et al.*, 1983).

➤ Les acides teichoïques (TA)

Les acides teichoïques anioniques peuvent séquestrer des cations divalents et/ou offrir une barrière physique pour empêcher la diffusion de certaines substances (Navarre *et al.*, 1999). 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 teichoïques 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). L'estérification avec de la D-alanine conduit à une diminution dans la charge négative de surface de la bactérie ayant des conséquences sur l'adhésion.

6.2 Les composants de surface

➤ Les protéines de surface

L'interaction entre la bactérie et l'hôte passe tout d'abord par la capacité de la bactérie à Adhérer aux composants de la matrice extracellulaire de la cellule hôte Pour cela, les Protéines de surface jouent un rôle primordial dans l'adhésion et initient ainsi la colonisation. Les protéines de surface se décomposent en deux classes, les protéines de surface ancrées à la paroi bactérienne, MSCRAMMs et les protéines de surface sécrétées, SERAMs, La Protéine A est la protéine de surface la plus abondante chez *S. aureus*.

➤ Les adhésions ancrées dans la paroi (MSCRAMMs)

S. aureus possède un grand nombre de protéines de surface appelées andésines qui ont la capacité de se fixer sur les molécules de l'hôte (ou à des surfaces inertes type cathéters), La grande majorité de ces adhésines (Tableau 2) appartiennent à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molécule) (**Foster et al., 1998**).

Parmi les mieux caractérisées on peut citer notamment la protéine de liaison au collagène CNA, les protéines de liaison à la fibronectine FnBPA et FnBPB, les protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor) ClfA et ClfB et la protéine A (ou SpA) qui possède également une activité super antigénique (**Clarke et al., 2006**).

Tableau II : Protéines de surface (MSCRAMM) chez *S. aureus* (Ghellai, 2016)

Protéines	Rôle	Références
Protéine A ou Spa (staphylococcal protein A)	Liaison immunoglobulines IgG et IgM. Liaison facteur de Von Willebrand	(Foster et Hook, 1998)
ClfA (Clumping factor A) ClfB (Clumping factor B)	Liaison à la chaîne γ fibrinogène	(Sabat <i>et al.</i> , 2003)
EbpS (Elastin-binding protein)	Liaison élastine et tropoélastine solubles	(Tristan <i>et al.</i> , 2003)
FnbpA (Fibronectin-binding ptotein A) FnbpB (Fibronectin-binding ptotein B)	Liaison fibronectine	(Tristan <i>et al.</i> , 2003)
Cna (Collagen-binding protein)	Liaison collagène	(Tristan <i>et al.</i> , 2003)

6.3 Les composants sécrétés

6.3.1. Les exoenzymes et protéines

➤ La coagulase libre (staphylocoagulase)

Est une protéine diffusible thermostable exprimée pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne (Cheng *et al.*, 2010). La sécrétion de la coagulase est le caractère taxonomique essentiel de l'espèce (Ferron, 1984). C'est une enzyme extracellulaire, thermostable peu antigénique. Néanmoins, elle entraîne l'apparition d'anticorps inhibant son activité biologique, ils sont généralement présents dans le sérum des sujets sains (Le Minor *et al.*, 1990). Elle est capable de coaguler en quelques heures le plasma humain (ou de lapin) prélevé sur héparine, Oxalate ou EDTA (Fauchere *et al.*, 2002). Cette protéine est d'origine chromosomique. Son PM (Poids Moléculaire) varie selon les souches de 31 à 58 kDa et son PI (point Isoélectrique) est de 5,5. Sa formation ne nécessite pas la présence de calcium. Elle n'est pas activée par le fibrinogène purifié. Pour agir, elle a besoin d'une globuline

plasmatique voisine ou analogue à la prothrombine (coagulase réacting factor) (**Le Minor et al., 1990**).

➤ **Coagulasse liée**

A côté de cette coagulasse "libre", il existe aussi une autre substance insoluble qui paraît être fixée au corps bactérien appelée coagulasse liée ou "clumping factor" qui peut être rencontrée chez certaines espèces de staphylocoques coagulase négative, telles *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* et certaines souches de *S. intermidis* (**Le Minor et al., 1990**). Elle est responsable de la formation d'une sorte de coque autour des germes qui deviennent ainsi résistants à la phagocytose et entraînent la formation d'embolies septiques [(**Fauchere et Avril, 2002**) ; (**Ferron, 1984**)].

➤ **La fibrinolysine**

La fibrinolysine ou staphylokinase c'est une enzyme qui active le plasminogène en plasmine. Elle agit sur le plasma humain, de chien, de cobaye et de lapin, et est généralement produite par les souches d'origine humaine. Du point de vue génétique, elle peut être soit d'origine chromosomique, soit d'origine phagique; Deux phages convertisseurs de sérotypes différents ont été isolés; le phage de groupe F provoque simultanément la perte de la β -hémolysine et le gain de la staphylokinase, tandis que, celui du groupe B provoque le gain de la seule staphylokinase [(**Ferron, 1984**) ; (**Le Minor et al., 1990**)].

➤ **Lipases**

Les lipases sont un ensemble de protéines regroupant les lipases elles-mêmes, les Phosphatases et les estérases. Elles sont capables de métaboliser les graisses cutanées et jouent un rôle dans la dissémination de l'infection 80 81 La lipase semble aussi avoir un rôle dans le prélèvement des nutriments dans l'environnement, dans la formation de biofilms et d'abcès, participant ainsi la pathogénicité de *S. aureus* (**Hu et al., 2012**). Ainsi, des souris infectées avec une souche mutante pour la lipase ont un défaut dans la formation d'abcès et une moindre charge bactérienne dans différents organes comparés à la souche sauvage.

➤ Protéases

Elles hydrolysent certaines protéines, telle que la staphylokinase, et contribuent à la destruction du caillot et à la formation de micro emboles bactériens, responsables de métastases septiques (EL Kouri *et al.*, 1998). On distingue au moins trois types connus: serine-protéase, métalloprotéase et thiolprotéase. La serine-protéase possède un résidu sérine au niveau de son site et coupe le lien peptidique sur le site carboxy terminal des acides aminés dicarboxyliques; cette enzyme serait elle-même activée par la métalloprotéase. La thiolprotéase n'est active qu'en présence d'agents réducteurs (Le Minor *et al.*, 1990).

➤ La Béta-lactamase

La Béta-lactamase qui est une enzyme située dans la membrane cytoplasmique Responsable de l'inactivation de la pénicilline. L'apparition d'une nouvelle béta_lactamase est actuellement responsable de la résistance des staphylocoques aux pénicillines pénicillase-résistantes et aux céphalosporines, La coagulase qui est un activateur de la prothrombine, permet la conversion du fibrinogène en fibrine. Cependant son implication dans la virulence de la bactérie est incertaine (Lowy, 1998).

➤ Catalase

La catalase convertit le peroxyde d'hydrogène produit par les neutrophiles en molécules d'eau et d'oxygène. Elle empêche ainsi la formation de radicaux oxygénés toxiques pour la bactérie et améliore ainsi sa survie dans le phagocyte (Mandel *et al.*, 1975). En réalité, il semblerait que la catalase soit nécessaire à la prolifération intracellulaire plutôt qu'à la survie à proprement parler. En effet, Martinez et collaborateurs ont montré que la survie intracellulaire de *S. aureus* dans des macrophages murins ou des cellules épithéliales bovines était similaire entre la souche mutante pour la catalase et la souche sauvage. En revanche, l'absence de catalase est associée à une inhibition de la prolifération intracellulaire dans les cellules épithéliales bovines (Martinez *et al.*, 2009).

6.3.2. Les toxines

Nous connaît actuellement une quinzaine de toxines sécrétées par *Staphylococcus aureus* (Free *et al.*, 1983). Mais seules certaines d'entre elles sont responsables de pathologies spécifiques. Leur mode d'action est encore imparfaitement connu. Elles possèdent une action spécifique sur leurs organes cibles : épiderme pour les exfoliatines, cellules du tractus digestif, on sait actuellement que ces toxines agissent comme des super antigènes (Marrack *et al.*, 1990). c'est-à-dire des molécules capables d'activer un grand nombre de

cellules T, avec pour conséquences une forte activation immunitaire et une libération de grandes quantités de cytokines, ce qui représente l'un des éléments essentiels de la pathogénie du syndrome de choc toxique (**Choi et al., 1990**).

➤ Les entérotoxines

Ce sont des exotoxines protéiques relativement thermostables et résistantes aux enzymes digestives, agissant sur les récepteurs neurovégétatifs mésentériques. Elles sont caractérisées par leur PM compris entre 27.8 et 34.1 kDa, leurs points isoélectriques et leur sérotypie. Sur le plan antigénique, huit entérotoxines sont identifiées: A, B, C1, C2, C3, D, E et H. Leur production est assez répandue chez *S. aureus*, elles ne sont élaborées que par certaines souches appelées staphylocoques entérotoxigènes (**Avril et al., 2003**). Les maladies provoquées par ces souches se présentent sous deux formes particulières [(**Ferron, 1984**) ; (**Le Minor et al., 1990**)].

➤ Les toxines à tropisme membranaire

• Toxine alpha" Structure et fréquence.

La liaison de cette toxine aux membranes cellulaires y entraîne la formation de pores heptaédriques (**Song et al., 1996**). La formation du pore heptaédrique est ATP-indépendante, et l'énergie requise pour produire le pore doit provenir du changement de conformation des monomères de toxine, est celle d'un champignon dont le chapeau se localise sur la face externe de la membrane de la cellule-cible et dont le pied s'insère dans la membrane cytoplasmique. Le canal qui traverse ce complexe heptaédrique en son centre, c'est-à-dire transversalement au centre du chapeau, puis longitudinalement au centre du pied, a un diamètre variant de 1,4 à 4,6 nm La partie transmembranaire du pore est formée par quatorze feuilletts plissés bêta.

• Toxine bêta " Structure et fréquence "

La toxine bêta est une protéine de 39 kDa dont le gène a été cloné et séquencé [(**Murray et al., 2003**) ; (**Humphreys, 2002**)]. Ce gène peut être inactivé naturellement par l'insertion de phages convertisseurs portant les gènes de l'entérotoxine A et de la staphylokinase. Seules 18 % des souches cliniques d'origine humaine produisent cette toxine, alors que celle-ci semble être plus fréquemment synthétisée par les souches isolées de mammites bovines.

➤ **Activité fonctionnelle**

La toxine bêta est en réalité une phospholipase de type C coupant la sphingomyéline en N-acylsphingosine et en phosphoryl-choline. Les membranes sont réellement lysées par une perturbation secondaire due par exemple au froid ou à l'action de l'EDTA ou de l'hémolysine delta de *S aureus*.

• **Toxine du syndrome de choc toxique 1 (TSST-1)**

La TSST-1 est une protéine extracellulaire qui agit comme un super antigène. Une fois dans le sang, elle va induire une forte réponse inflammatoire conduisant notamment à la libération de grande quantité de TNF α , conduisant au syndrome de choc toxique (**Jupin *et al.*, 1988**).

➤ **Exfoliatine ou épidermolysines**

• **Structure et fréquence**

S. aureus peut produire deux types sérologiques d'exfoliatine ayant chacun une masse moléculaire d'environ 27 kDa : celui de type A codé par un gène chromosomique et celui de type B codé par un gène plasmidique. Les souches productrices d'exfoliatine représentent environ 5 % des souches isolées en pratique clinique. Certaines souches peuvent produire les deux types d'exfoliatine à la fois. Un autre sérotype d'exfoliatine (type C) a été individualisé récemment à partir d'une souche isolée d'un phlegmon équin. La structure primaire des exfoliatines présente une homologie avec celle de certaines protéases à sérine. La structure tridimensionnelle de l'exfoliatine de type A vient d'être déterminée (**Cavarelli *et al.*, 1997**).

• **La toxine EDIN (épidermal cell différenciation inhibitor)**

Cette toxine de 27 kDa possède 35 % d'homologie avec l'ADP-ribosyltransférase C3 de *Clostridium botulinum*. Dénommée EDIN, elle catalyse l'ADP-ribosylation des protéines cellulaires Rho, qui appartiennent à la famille des petites protéines fixant le GTP. La toxine EDIN, dont le rôle dans la virulence de *S aureus* n'est actuellement pas connu, est utilisée pour étudier le fonctionnement des cellules eucaryotes qui sont sensibles à son action (**Sugai *et al.*, 1992**). Les toxines synergohyménotropes (la Leucocidine de Panton Valentine) La plus connue et la plus importante est la Leucocidine de Panton Valentine (LPV).

Le mécanisme d'action de la LPV est aujourd'hui connu, LukS-PV et LukF-PV agissent en synergie. La composante LukS-PV (hydrophile) va être reconnue par les récepteurs de la

membrane cellulaire puis la composante LukF-PV va s'oligomériser en octomère au contact de LukS-PV (Eveillard, 2007).

7. Facteurs de persistance

Afin de diffuser dans la population, *S. aureus* doit dans un premier temps être acquis par un individu non colonisé. La colonisation, notamment nasale, est l'étape cruciale de la diffusion interindividuelle de *S. aureus*. Les bactéries colonisant les fosses nasales servent à la fois de réservoirs pour la diffusion de cet organisme dans la population et prédisposent l'hôte à une infection subséquente. La durée de colonisation peut être variable et influence le risque de transmission de *S. aureus* à d'autres individus. En effet, plus cette durée est longue, plus la probabilité de transmettre la bactérie est importante (Lucet *et al.*, 2009).

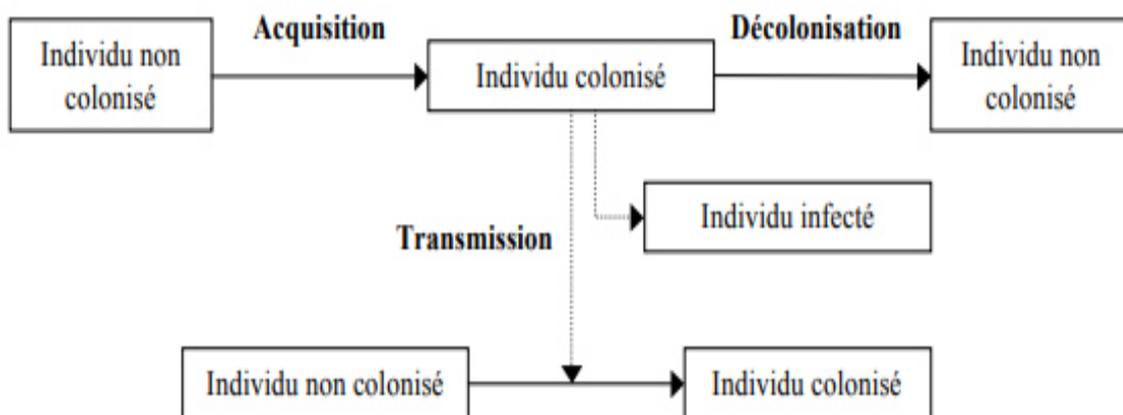


Figure 2: processus de diffusion de *S. aureus*

Le mode principal de transmission est par contact direct (via manu portage) avec des individus colonisés, en secteur hospitalier, le personnel soignant est une source importante de transmission de patient à patient, la transmission de SARM d'un individu colonisé aux membres de son foyer a également été documentée [(Lucette *et al.*, 2009) ; (Mollema *et al.*, 2010)]. Il semble que *S. aureus* peut être également transmis via l'environnement par contact avec des surfaces ou des objets contaminés, une étude a montré que cette bactérie était capable de survivre quelques jours à plusieurs semaines sur des matériaux fréquemment retrouvés à l'hôpital (Nelly *et al.*, 2000).

8. Régulation des facteurs de la virulence

Les protéines de surface sont synthétisées surtout au cours de la phase exponentielle de croissance alors que les molécules secrétées le sont principalement pendant la phase stationnaire. Cette expression séquentielle des gènes semble cliniquement importante et correspond aux besoins des différents stades de l'infection. En effet, les protéines de surface qui permettent la fixation de la bactérie à la matrice extracellulaire sont surtout utiles au début de l'infection afin de permettre la colonisation des tissus. Une fois cette colonisation réussie, la bactérie a besoin de se disséminer à travers les tissus adjacents, ce qui est favorisé par l'excrétion de protéines comme les protéases. L'expression de ces différents facteurs est coordonnée par des gènes régulateurs. Il a été montré que l'inactivation de ces gènes entraîne une diminution significative de la virulence de la bactérie (Lowy, 1998).

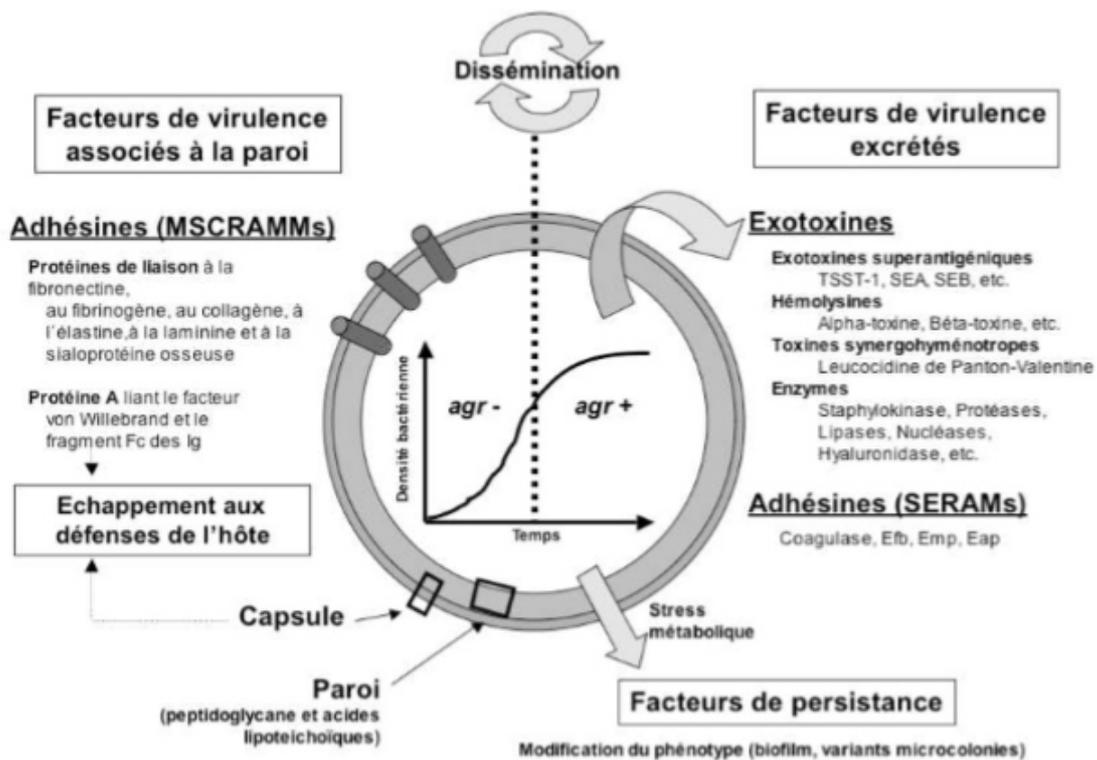


Figure 3 : Expression des facteurs de virulence et de persistance selon la croissance bactérienne et l'expression conséquente d'*agr* (for accessory gène régulateur). Lors de la phase exponentielle de croissance de *S. aureus*, les constituants de l'enveloppe et les composants de surface permettent l'adhésion de la bactérie et l'échappement aux défenses de l'hôte. Au début de la phase de décélération, l'expression du gène régulateur *agr* est induite et entraîne la sécrétion de nombreuses exotoxines favorisant la dissémination de la bactérie. Lors

d'un stress métabolique, *S. aureus* à la capacité de modifier son phénotype permettant la persistance de la bactérie. MSCRAMM : Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules. SERAM : Secretable expanded repertoire adhesive molecules. (Qazi *et al.*, 2001).

9. Facteurs de virulence et spécificité d'hôte

S. aureus est réparti en de nombreuses lignées générées par des recombinaisons multiples et des échanges d'éléments génétiques mobiles entre les différentes lignées. Chacune de ces lignées possède une combinaison unique de protéines de surfaces et de régulateurs, identifiées par des séquences types. L'évolution de *S. aureus* lui permet ainsi de s'adapter à différents hôtes et d'exprimer différents facteurs de virulence selon le Microenvironnement. Dans le but de mettre en évidence un lien possible entre la spécificité d'hôte et l'expression des divers facteurs de virulence de ces différentes lignées, Sung et ses collaborateurs ont comparés 217 isolats de *S. aureus*. Ces isolats comprennent 161 isolats humains porteurs ou invasifs et 56 isolats animaux (vaches, chevaux, moutons, chèvres et un chameau). La comparaison génétique de ces isolats a permis une classification de *S. aureus* en différentes lignées, comme le montre les différents clusters de la Figure 8. Les isolats humains et animaux ont chacun été classés en dix lignées différentes. Bien que la majorité des isolats animaux (61%) ait été classée dans des lignées non présentes chez l'homme, ils ne sont pas sur une branche distincte de l'arbre de *S. aureus*. L'analyse de 2013 gènes de base des isolats humains montre qu'ils ne sont pas uniformément absents des isolats animaux. Bien que certains gènes soient plus conservés, ou plus fréquemment exprimés (chp, scn et sak) chez l'homme, il n'existe pas de spécificité d'hôte à proprement parler. Ainsi, les isolats d'origine animale sont étroitement proches de ceux d'origine humaine et seuls quelques gènes ou combinaisons de gènes pourraient prédisposer ces isolats à développer des infections spécifiques de l'Homme ou de l'animal. Cette étude démontre que l'opportuniste prévaut de très loin sur la spécificité d'hôte et que le statut physiologique (immunitaire) de l'hôte est un facteur majeur influant sur la prédisposition à l'infection par *S. aureus* (Sung *et al.*, 2008).

10. Mécanisme de résistance

On dit qu'une souche bactérienne est résistante à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de tolérer une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que la concentration qu'il est possible d'obtenir *in vivo* à la suite d'un traitement.

_ **Souches pénicilline-résistantes**: ces souches, en plus de la production d'une pénicillinase, produisent une PLP modifiée (PLP2a) qui présente une affinité très diminuée pour la méticilline, ce type de résistance est chromosomique, inductible ou constitutive et implique une résistance croisée à toutes les β -lactamines.

10.1 Résistance à la pénicilline

Le gène *blaZ* qui code pour cette enzyme est porté par un plasmide ou transposon. Le gène *blaZ* est sous le contrôle d'un système répresseur/anti répresseur (*blaR1* / *blaI*) La production de β -lactamase est le plus souvent inductible (**Lowy, 2003**).

10.2 Résistance à la méticilline

Les β -lactamines ont pour cible les transpeptidases appelées aussi protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP interviennent dans la synthèse de la paroi bactérienne en catalysant la formation de ponts peptidiques entre les chaînes glycaniques (**Ghuysen, 1994**).

Les β -lactamines vont bloquer la polymérisation de la paroi bactérienne la rendant instable et fragile et provoquant secondairement la lyse de la bactérie. *S. aureus* produit naturellement 4 PLP, Le principal mécanisme de résistance à la méticilline est lié à la modification de la cible des β -lactamines. Les SARM synthétisent une 5ème PLP, la PLP2a (ou 2'), qui a une faible affinité pour les β -lactamines [(**Hartman et al., 1984**) ; (**Utsui et al., 1985**)].

Il est transporté dans un élément génétique appelé Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC) *mec* (**Katayama et al., 2000**). Il véhicule des copies de plasmides intégrées responsables de la résistance à des antibiotiques autres que les β -lactamines. Par analogie avec les îlots de pathogénicité décrits dans les entérobactéries, il peut être considéré comme un îlot de résistance aux antibiotiques. transcription, *mecI* *blaR1* / *MecR1* et *blaI* / système complexe de régulation avec deux systèmes répresseurs *blaR1* / Le complexe génétique *mec* [(**Archer et al., 2001**) ; (**Rosato et al., 2003**)]. comprend le gène de résistance proprement dit et un anti-répresseurs de la *mecI* et la souche apparaît sensible avec les techniques usuelles d'antibiogramme / Le système *mecI* *mecR1* est fonctionnel, la transcription du gène *mecA* est

très fortement inhibée/ mecR1 exerce une inhibition plus forte que blaI /Si le système Des gènes auxiliaires appelés femA, femB, femC, femD sont également impliqués dans l'expression de la résistance à haut niveau chez les souches présentant une résistance hétérogène à la méthicilline (**Berger, 1994**). Quatre types de SCCmec ont été décrits (type I à IV) sur la base des différents complexes ccr (types 1 à 3) et des classes du complexe mec (A et B). (**Hiramatsu et al., 2001**).

10.3. Résistance à la vancomycine

La cible des glycopeptides est le résidu D-ala-D-ala du peptidoglycane. Le mécanisme de résistance hétérogène à la vancomycine (souches hétéro-VISA et VISA) est lié à un épaississement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé (**Hiramatsu et al., 2001**). La base génétique de la résistance n'est pas encore comprise. Elle n'est pas liée au gène mecA (**Walsh et al., 2002**).

Les souches exprimant une résistance de haut niveau à la vancomycine (VRSA) hébergent le gène vanA présent habituellement chez les entérocoques résistants aux glycopeptides [(**Chang et al., 2003**) ; (**Weigel et al., 2003**)].

➤ Autres résistances

Les aminosides inhibent la synthèse protéique. Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, tobramycine, gentamicine) est lié à la sécrétion d'enzymes qui dénature les antibiotiques. On distingue trois phénotypes de résistance (tableau VI)[(**Bismuth et al., 2000**) ; (**Quincampoix et al., 2001**)]. une résistance de haut niveau à la kanamycine et l'amikacine (phénotype K) - une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine (phénotype KT) - une résistance de haut niveau à la kanamycine, à l'amikacine, à la tobramycine, à la gentamicine (phénotype KTG).

Les Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS) inhibent la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosome et ARN de transfert (**Quincampoix et al., 2001**). Les mécanismes de résistance aux macrolides (érythromycine, spiramycine), Lincosamides (clindamycine) et Streptogramines (pristinamycine, quinupristine-dalfopristine) comprennent la Modification de la cible, des systèmes d'efflux et des enzymes inactivatrices. Les fluoroquinolones (ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacine) inhibent la croissance bactérienne par arrêt de la croissance bactérienne. La résistance aux fluoroquinolones est due à une modification de la cible, soit la topo-isomérase IV par mutation des gènes

chromosomiques *grlA* ou *grlB* soit les sous-unités de la gyrase par une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*, ou à un système d'efflux grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène chromosomique *norA*. La résistance aux tétracyclines est due soit à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* ou *tetL* d'origine plasmidique soit une protection de la cible par une protéine codée par le gène transposables *tetM*. La résistance à la rifampicine est liée à la sélection de mutants résistants au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN dépendante. Parallèlement à ce mécanisme, les *S. aureus* résistants à la méthicilline sécrètent pratiquement toujours des β -lactamines et sont très souvent résistants à de multiples autres antibiotiques, comme si la présence du gène *mecA* facilitait l'acquisition d'autres éléments génétiques de résistance (Nauciel *et al.*, 2005).

11. Epidémiologie et mode de transmission

Le réservoir naturel de *S. aureus* est l'homme, un pourcentage élevé de la population reste porteur en permanence ou par intermittence en particulier dans les fosses nasales (Wertheim, 2005).

Dans une étude récente conduite aux Etats-Unis on retrouve précisément 28,6% de portage nasal SARM et 1,5% à SARM (Fasquelle, 1974). Dans des études similaires réalisées dans plusieurs pays du monde, ils ont pu obtenir un taux de portage nasal variable : France (Paris) 18%, Algérie (Tlemcen) 27%, Mali 22%, Moldavie 25%, et Cambodge 12% (Chadli *et al.*, 2014).

Les SARM sont responsables d'infections nosocomiales et sont devenues endémiques dans de nombreux hôpitaux. On assiste ces dernières années, en Algérie, à une augmentation importante du taux des SARM, qui est passé de 10 % en 1997 aux environs de 40 % en 2005 [(Peacock *et al.*, 2001) ; (Nouwen *et al.*, 2004)]. Comparée aux autres pays du Maghreb, l'Algérie enregistre la plus forte prévalence de SARM [(Sami, 2013) ; (Borg *et al.*, 2007)]. Des études similaires, conduites dans les 5 dernières années, rapportent la prévalence du portage nasal de *S. aureus* dans les différents continents (Figure 4).

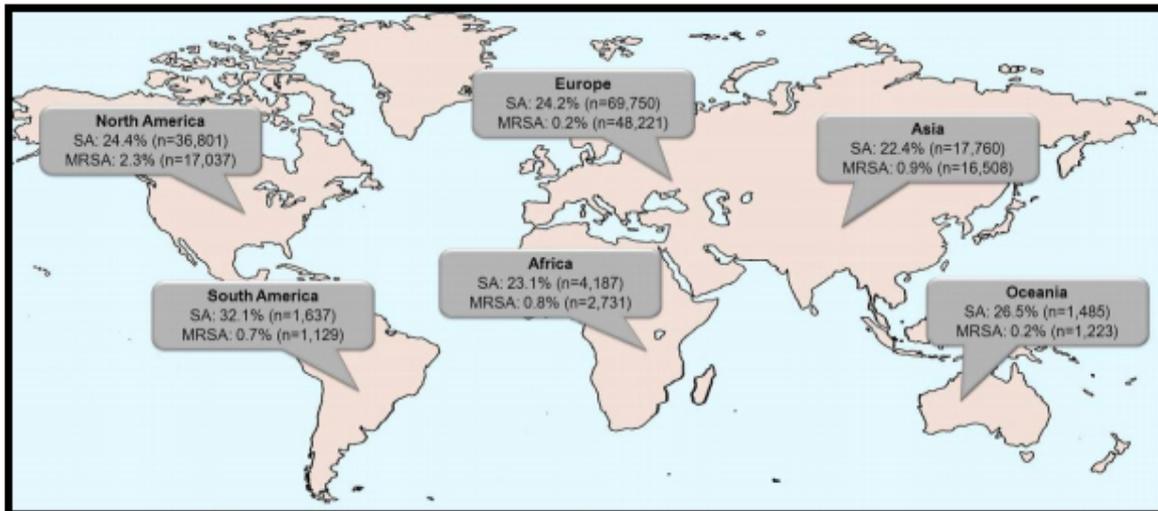


Figure 4: La prévalence du portage nasal de *S. aureus* entre 2005 et 2012 dans le monde (Verhoeven *et al.*, 2014).

S. aureus peut survivre des mois sur tout type de surface. Les mains sont probablement le vecteur principal de transmission du *S. aureus*, car en contact avec les fosses nasales, notamment avec la zone antérieure (vestibule nasal) (Wertheim *et al.*, 2006). L'autre hypothèse est que le *S. aureus* atteigne les cavités nasales directement par diffusion aérienne. Il a été montré que les patients porteurs de *S. aureus* atteints de rhinite répandent plus de micro-organismes dans l'environnement (Sherertz *et al.*, 2001). Au niveau anatomique, le *S. aureus* colonise le vestibule des fosses nasales qui est dépourvu de cils et qui contient peu de mucus, riches en peptides antimicrobiens. Les études in-vitro (Peschel, 2002) ont montré que le *S. aureus* est capable de résister à certains peptides antimicrobiens.

Cependant, la niche écologique dominante de *S. aureus* est la partie antérieure du nez: *S. aureus* est retrouvé chez 15 à 30 % des individus sains au niveau des fosses nasales et de la gorge, il est également présent (en faible quantité) dans le tube digestif et le périnée. A partir du rhinopharynx, la bactérie est disséminée sur la peau (mains et visage) par aérosols et est souvent présente sur les vêtements et dans les squames (qui font partie de la poussière de tout local habité) (Sami, 2013).

Chapitre II : Généralités sur les biofilms bactériens

1. Historique

Les micro-organismes se fixent sur des surfaces (vivantes ou non vivantes), forment des « tapis » qui conduisent à la colonisation totale de la surface. Ces tapis bactériens constituent des « *biofilms* ». Van Leeuwenhoek est le premier chercheur qui a examiné des biofilms bactériens sur la surface de ses propres dents au XVII^{ème} siècle (**Donlan et al., 2002**).

La première étude scientifique consacrée aux biofilms date de 1943 (**Zobell, 1943**). Depuis, des biofilms ont été observés dans de nombreux environnements. La prédominance du mode de vie sous forme de biofilm ne fut cependant affirmée qu'en 1978. Il a été montré que plus de 99% des bactéries se développent en biofilms [(**Donlan, 2002**) ; (**Coghlan, 1996**)].

En 1932, Henerici observa des communautés bactériennes fixées sur des lames de verre placées dans un aquarium. Selon cet auteur, la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface [(**Henerici, 1932**) ; (**Trautner et al., 2009**)].

Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Claude E. zobell en 1943, il montra que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation de communautés bactériennes fixées sur les surfaces (**Costerton, 2004**).

En 1978, **Costerton et al.**, ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont proposé la théorie de «biofilms», qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent aux surfaces vivantes et inertes et les avantages accumulés par cette niche écologique [(**Branger et al., 2007**) ; (**Kara Terki, 2014**)].

Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriel, environnementale et médicale. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (**Donlan, 2002**).

2. Définition

Un biofilm peut être défini comme une communauté microbienne attachée à une surface et fréquemment englobée dans une matrice d'exopolymères. Les cellules sessiles présentent des caractéristiques particulières tant au niveau de la croissance que de l'expression génétique et de la production de protéines [(Costerton *et al.*, 1995) ;(Jefferson, 2004)].

Dans l'environnement, les bactéries vivent préférentiellement sous forme de biofilms [(costerton *et al.*, 1995) ; (Zobell, 1943)].

Les biofilms sont présents sur terre depuis des milliards d'années .Toute surface solide en contact avec un fluide contenant des bactéries sont susceptible d'être support d'un biofilm. Certains estiment qu'il représente le mode de vie de plus 99% des bactéries terrestres (DuPont , 2000).

L'existence du mode de vie en biofilm a été envisagée depuis les travaux de Henrici et Zobell au début des années 40 [(Henrici, 1933); (Zobell, 1943)]. Ce n'est qu'à partir des années 1980 que ce concept a été généralisé à des environnements variés par Bill Costerton (Costerton, 1978). Depuis, l'intérêt pour la recherche scientifique sur les biofilms croît de manière exponentielle : plus de 5000 publications sur le sujet sont recensées entre 2000 et 2010 (Karunakaran *et al.*, 2011).

Il n'existe pas de consensus absolu sur la définition d'un biofilm et il est encore possible de trouver quelques divergences suivant les auteurs (Costerton, 1999).

Le biofilm bactérien peut se définir comme une communauté de microorganismes enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et en contact avec une surface (Filloux *et al.*, 2003). L'organisation, la forme, et la densité de ces assemblages ne sont pas liées au hasard, cette construction est une réponse aux variations des conditions écologiques (Melchiour *et al.*, 2006). Ce sont des communautés hétérogènes, qui peuvent se composer d'une seule espèce de bactéries ou de champignons ou, plu; fréquemment, ils peuvent être polymicrobiens (Phillips *et al.*, 2011).

Ce comportement des bactéries apparaît comme une réponse adaptative à un environnement plus ou moins hostile, il conduit à des modification des fonctions métaboliques et de l'expression des facteurs de virulence, ainsi qu'une sensibilité diminuée aux moyens de défense naturels ou non de l'hôte, favorisant ainsi aux bactéries de nombreux avantages (Davey *et al.*, 2000).

Les biofilms bactériens sont définis comme des agrégats de cellules bactériennes (**Jacques *et al.*, 2010**), attachées de manière irréversible à un substrat, une interface ou tout simplement entre elles, enrobées d'une matrice extracellulaire de substances polymériques ou EPS (en général d'exopolysaccharides) (**Dolan *et al.*, 2002**).

Les biofilms sont très hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Ils sont constamment remodelés, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes. Ils présentent une grande diversité aussi bien au niveau structural (une ou plusieurs espèces de micro-organismes au sein du biofilm, épaisseurs diverses) qu'au niveau des supports colonisés. Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes (**Tolker *et al.*, 2000**).

La plupart des biofilms rencontrés sont hétérogènes. La présence d'une espèce de micro-organisme ou d'une autre au sein du biofilm dépend des conditions environnementales (**Wanner *et al.*, 2006**).

3. Formations des biofilms chez *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont responsables de la grande majorité des infections causées par des biofilms (**Otto, 2008**). Un des facteurs de virulence des staphylocoques est leur capacité à adhérer à une surface et former des biofilms [(**Parsek *et al.*, 2003**) ; (**Del Pozo *et al.*, 2007**)]. La présence de films protéiques sur des implants médicaux en contact direct avec un fluide favorisent la formation de biofilms. Par exemple, les cathéters veineux centraux, en contact direct avec le sang, sont recouverts de plaquettes, de plasma et de protéines: albumine, fibrinogène, fibronectine, laminine... (**Goller *et al.*, 2008**).

Un exemple de structure de biofilms de *S. aureus* formés sur des dispositifs médicaux retirés des patients et observés par microscopie électronique à balayage est présenté dans la **figure 5**. On remarquera une organisation spatiale multicouches de cellules coccoïdes associées à la surface et formant une structure 3D dense et macroscopiquement homogène (**Boles *et al.*, 2011**).

De nombreuses études ont été réalisées sur des modèles de biofilms de *S. aureus* in vitro (biofilms synthétiques sur matériaux inertes) et in vivo (modèles animaux) afin de disséquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ces biostructures [(**Knobloch *et al.*, 2002**) ; (**Coenye *et al.*, 2010**)].

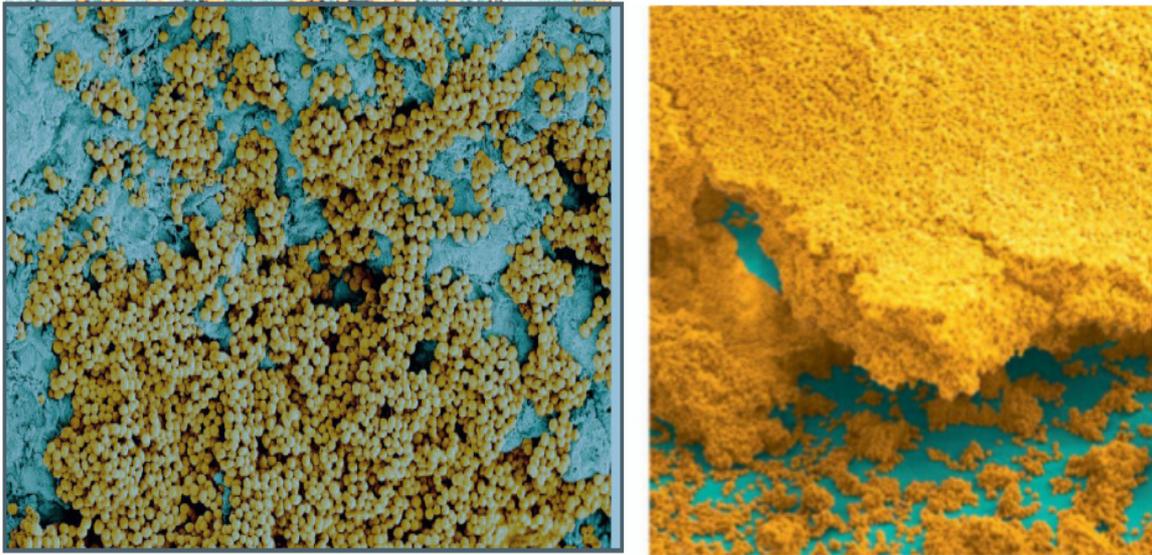


Figure 5 : Images obtenues par microscopie électronique de cellules de *S. aureus* adhérentes et formant des biofilms chez l'hôte sur une valve cardiaque (à gauche) et un tube endotrachéal (à droite) (Figure reproduite avec permission de l'éditeur « Elsevier » : Trends in Microbiology (Boles *et al.*, 2011).

On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms (Figure 7), Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon réversible par Des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on Parle d'adhérence (Figure 7 (a)) [(Golovlev, 2002) ; (Van Houdt, 2005)]. Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pilis, et synthétisent une matrice d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'adhésion (Figure 7 (b)). On distingue ensuite des phases de croissance (Figure 7 (c)) et de maturation du biofilm (Figure 7 (d)). Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm (Figure 7 (e)), et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle d'essaimage du biofilm (Clutterbuck, 2007).

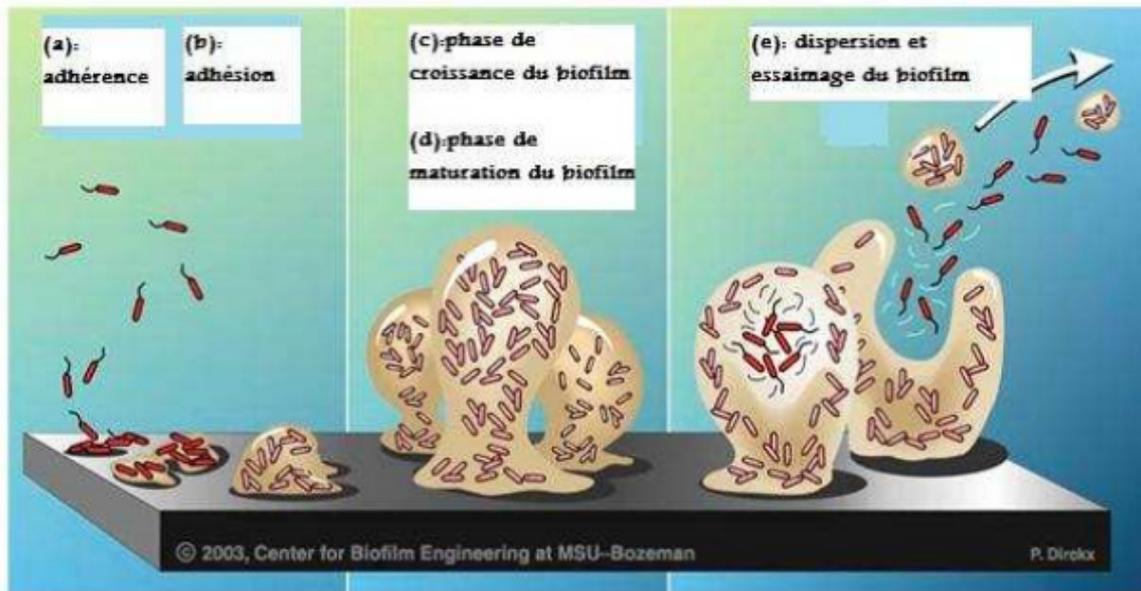


Figure 6 : Cycle de développement simplifié d'un biofilm. **Anonyme 2.**

Les bâtonnets rouges représentent les bactéries à l'état planctonique et celles figurées en beige à l'état de biofilm. Ce dernier est représenté en beige. Les cinq stades successifs du passage d'un de ces états à l'autre sont schématisés : (a), (b), (c), (d) et (e) (**Clutterbuck, 2007**).

3.1 Adhésion réversible

La première étape correspond à la détection d'une surface par les cellules bactériennes. Cette étape permet la transition de l'état planctonique à l'état sessile. Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. Chez *S. aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhésin ») D'après (**Lister et al., 2014**).

L'approche des bactéries de la surface dépend des propriétés dynamiques du milieu (la concentration en oxygène et en nutriments et vitesse d'écoulement et l'hydrodynamique de fluide et des propriétés physico chimiques de la surface le pH, l'osmolarité, la température [(**Katsikogianni et al., 2004**) ; (**Beloin et al., 2008**)]. Le contact entre la bactérie et le substratum mettent en jeu les forces attractives de Van Der Waals, et les forces électrostatiques répulsives (**Chmielewski et al., 2003**). Sachant que les cellules bactériennes et les surfaces sont entourées d'une couche ionique négative, la superposition de celle-ci conduit à une répulsion électrostatique. (**Van der Mei, 2001**).

L'hydrophobicité des cellules et de la surface de contact est associée à l'adhésion initiale (**Busscher *et al.*, 1984**). L'effet de l'hydrophobicité peut varier en fonction de trois composants étudiés : l'organisme, le milieu, et la surface. L'hydrophobicité des bactéries, variable selon les espèces et l'état physiologique des bactéries concernées, par les substances polymériques extracellulaires produites par celle-ci (**Van der Mei, 1998**). .

Les adhésines de *S. aureus* les mieux caractérisées sont les protéines de liaison à la fibronectine, FnBPA et FnBPB, la protéine de liaison au collagène Cna, les protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor) ClfA et ClfB, et la protéine A (SpA pour staphylococcal protein A) [(**Foster *et al.*, 1998**) ; (**Corrigan *et al.*, 2009**)]. Le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhesin ») (**Acriola, 2015**).

Ces protéines de surface jouent un rôle dans la capacité du staphylocoque à coloniser les tissus en se fixant aux cellules et à la matrice extracellulaire (**Planchon, 2006**). Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. chez *S. aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhesin ») (**Lister *et al.*, 2014**). Il est suivi par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface.

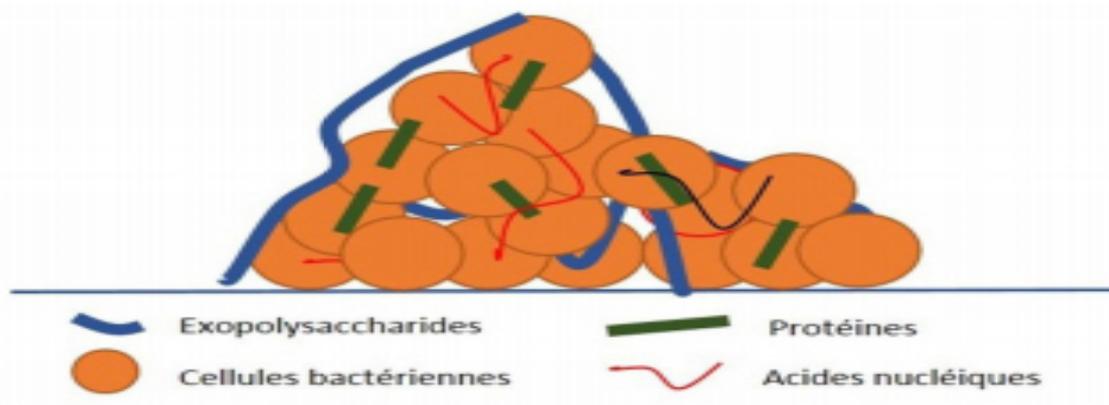


Figure 8 : composition de biofilm (D'après Lister *et al.*, 2014).

3.2 L'adhérence irréversible

L'adhésion irréversible va conduire à la présence de cellules isolées, voire d'agrégats à la surface du matériau ou de la muqueuse. L'étape de colonisation consiste en une Accumulation plus ou moins intense et rapide par division cellulaire des bactéries adhérentes mais aussi par recrutement continu de bactéries planctoniques (**Capdeville et al., 1990**).

La fixation à la surface solide devient irréversible et spécifique au substrat en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries (**Høiby, 2011**). Et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes.

Ces adhésines sont regroupées sous l'appellation de MSCRAMMs pour Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, elles ont la capacité de lier de nombreuses protéines humaines comme la fibronectine ou le fibrinogène ce qui permet à *S. aureus* de se lier de manière covalente aux surfaces biotiques. En ce qui concerne les surfaces abiotiques, la liaison se fait par l'intermédiaire de liaisons chimiques non spécifiques (liaisons hydrogènes, forces de Van Der Waals, interactions hydrophobes et interactions acide-base) ainsi que par liaison aux protéines de l'hôte fixées sur la surface (**Otto M, 2008**). Le nombre de cellules microbiennes augmente et donc la distance entre deux cellules diminue (**Alnasouri, 2010**). L'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support avec des liaisons fortes de type hydrophobes [(**Brangeret et al., 2007**) ; (**Bellifa, 2014**)].

La principale molécule permettant l'adhésion est un polysaccharide initialement décrit chez *S. epidermidis* appelé PIA pour Polysaccharide Intercellular Adhesin (**Rohde et al., 2010**).

Le PIA est un polymère de β 1-6-N-Acétyl-Glucosamine partiellement déacétylé (20% environ) qui associé aux acides téichoïques et aux protéines staphylococciques forme ce qu'on a longtemps appelé « slime » et qui est en fait la matrice extracellulaire composant le biofilm. (**Otto, 2008**). Sa production n'est pas exclusive à *S. aureus* ni même au genre *Staphylococcus*, on le retrouve chez de nombreuses bactéries pathogènes productrices de biofilm (**Darby et al., 2002**).

Parmi les facteurs responsables de l'agrégation intercellulaire 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* (cf. section 6.1) [(**Cramton et al., 1999**) ; (**Allignet et al., 2001**)]. la protéine associée à l'accumulation « Accumulation Associated Protein » (AAP) décrite chez *S. epidermidis* (cf.

Section 6.2) (**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**).

L'agrégation ou adhésion intercellulaire constitue la deuxième étape de formation d'un biofilm, Cette étape fait principalement intervenir des composés de surface comme l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA), la protéine associée à l'accumulation (AAP) et la protéine associée au biofilm (BAP), Grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries favorisant leur fixation à un support et conduisant à des fortes interactions avec des liaisons covalentes entre les bactéries et la surface, grâce à la présence des flagelles, des pilis et des adhésines (**Vallet et al., 2001**).

La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm [(**Spiers et al., 2003**) ; (**Kuchma et al., 2005**)]. et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature (**Suci et al., 1994**).

3.3. Formation de micro-colonies

La troisième phase est l'agrégation intercellulaire qui conduit à la formation de microcolonies, qui sont considérées comme étant les unités organisationnelles fondamentales d'un biofilm (**Shunmugaperumal, 2010**). Cette étape inclut la division cellulaire ainsi que la production d'exopolysaccharides et conduit à l'établissement d'un biofilm mature [(**Cramton et al., 1999**) ; (**Allignet et al., 2001**)].

La formation de micro-colonies permet donc de focaliser la croissance des cellules à de multiples endroits de la surface et d'accroître l'adhésion avec celle-ci jusqu'à recouvrir entièrement la surface. En plus de la formation des micro-colonies, les cellules à cette étape-ci vont commencer à produire un polymère extracellulaire (EPS) qui va les ancrer à la surface et conduire à l'attachement irréversible (**Boyd, 1995**).

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

Lorsque la densité microbienne est suffisante, commence alors la sécrétion de la matrice. Cette matrice est une substance extracellulaire polymérique (SEP) dont la composition varie selon les espèces bactériennes (**Phillips et al., 2010**). Cette matrice inclut tous les éléments du biofilm autre que les microorganismes. Elle est essentiellement composée

D'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Néanmoins, on peut également y trouver d'autres composants, tels que de l'ADN, de l'ARN et des lipides **(Sutherland, 2001)**.

3.4. Maturation

Le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel **[(Davey *et al.*, 2000); (Sauer *et al.*, 2002)]**. Dans cette structure tridimensionnelle se forment des canaux aqueux et de pores entre les micro-colonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets **[(Costerton *et al.*, 1999) ; (Folkesson *et al.*, 2008)]**.

La production et la sécrétion d'enzymes provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments qui favorise le grandissement et la croissance du biofilm jusqu'à devenir macroscopique **[(Jacolbsen *et al.*, 2008) ; (Alnnasouri, 2010)]**.

la maturation du biofilm sera régit par des forces d'adhésion notamment pour permettre l'agglutination des bactéries entre elles mais également par des forces perturbatrices qui vont quant à elles permettre au biofilm d'acquérir sa structure finale mais également plus tardivement de permettre le détachement d'amas de cellules bactériennes du biofilm **(Otto, 2013)**. La SEP s'épaissit, des canaux reliant les colonies se forment, les diverses structures évoluent selon le milieu. En fait, le biofilm devient un écosystème.

La maturation du biofilm est divisée en **deux phases (Clutterbuck, 2007)**. La première phase est marquée par des régulations de gènes importantes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elle concerne essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support **(Sauer, 2002)**.

La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm, L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation **(Clutterbuck, 2007)**. Soixante-dix gènes subiraient des modifications au cours de la maturation d'un biofilm **(Whiteley, 2001)**.

Les échanges avec le milieu environnant persistent, conduisant à un remaniement constant de l'expression des gènes et donc du comportement et de la structure du biofilm. A ce stade, et bien qu'en perpétuelle évolution, le biofilm est caractérisé par une perte de sensibilité aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements antimicrobiens qu'ils soient de nature physique ou chimique [(Costerton, 1984) ; (Campanac *et al.*, 2002)].

3.5 Dispersion du biofilm

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion [(Allison *et al.*, 1998) ; (Davey *et al.*, 2003)].

Les microorganismes peuvent se séparer sous effets du vieillissement du biofilm, certains stress ou carence et ils retournent à l'état dit « planctonique ». Ces formes planctoniques sont reléguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm. Des remaniements génétiques sont à l'origine du détachement des formes planctoniques (Brangeret *et al.*, 2007). Ce dernier permet non seulement de promouvoir une diversité génétique mais aussi de favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms (Clutterbuck, 2007). Cette étape est assurée par des enzymes et des peptides surfactants (PSMs).

Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement (Parot, 2007).

La mort des cellules du biofilm fait aussi partie du processus de renouvellement et de dispersion de la biomasse. Un mécanisme original régissant l'autorégulation de la population des biofilms est proposé par (Webb *et al.*, 2003).

Le détachement de bactéries est un processus complexe qui un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Joshi *et al.*, 2010).

4. Structure et composition du biofilm

4.1. Les différentes formes d'un biofilm

Dans les conditions naturelles, les bactéries existent sous deux formes : une forme libre ou planctonique, et une forme sessile ou attachée en biofilm. Les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes (Clutterbuck, 2007).

Un mode de vie planctonique : mode de flottaison libre et isolé permet aux microorganismes de se **proliférer** et de **coloniser** de nouvelles niches environnementales, [(Chalvet, 2009) ; (Klein, 2011)]. C'est la forme minoritaire, la plupart de ces micro-organismes, souvent regroupés en amas mobiles sont animés par des mouvements browniens et sont dépourvues de toutes attaches à une surface (Clutterbuck, 2007).

Un mode de vie sessile : Sur les surfaces naturelles, ou synthétiques, la plupart de ces micro-organismes peuvent alors adopter une forme de vie sessile, qui est le mode de vie majoritaire des bactéries qui forment des amas adhérents en remaniement permanent, Une fois attachées à une surface de façon irréversible et à une interface, les bactéries se développent formant une matrice [(Chalvet, 2009) ; (Klein, 2011)].

Ces bactéries produisent et accumulent des polymères extracellulaires, formant une matrice extracellulaire à forte teneur en eau. Les bactéries sont immobilisées au sein de cette matrice. Leur proximité entre elles leur permet de réaliser des échanges de signaux et de nutriments. C'est cet ensemble qui forme le biofilm, Il confère à la communauté bactérienne une véritable protection contre un certain nombre de stress environnementaux comme la dessiccation ou encore l'action d'agents antimicrobiens (Clutterbuck, 2007).

Le choix de ce mode de vie implique des changements majeurs dans l'utilisation de l'information génétique et de l'énergie cellulaire et à des conséquences profondes pour la physiologie bactérienne (Romeo, 2008).

Les bactéries sessiles sont protégées de l'action des anticorps par la structure même du biofilm (rôle de la matrice). Les anticorps synthétisés éliminent alors uniquement les bactéries planctoniques qui se sont détachées du biofilm. Ils ne peuvent pas détruire les bactéries du biofilm et endommagent les tissus voisins (Costerton, 1999).

Ces communautés sessiles de micro-organismes exercent un chimiotactisme sur les phagocytes, qui sont alors attirés localement. Mais les biofilms sont résistants aux anticorps, aux phagocytes et aux antibiotiques. Les phagocytes sont donc inefficaces sur les biofilms : la phagocytose n'a donc pas lieu, mais on assiste à une libération massive locale d'enzymes phagocytaires. Les enzymes phagocytaires libérées localement vont endommager les tissus avoisinants et éroder la surface du biofilm, entraînant la libération de bactéries planctoniques qui vont essaimer à partir du biofilm [(Percival a, 2004) ; (Percival b, 2004)].

4.2. Diversité des biofilms

Le terme de biofilm pourrait laisser entendre qu'il s'agit d'une simple couche de micro-organismes déposée sur une surface. Les biofilms sont très hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Ils sont constamment remodelés, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes, Ils présentent une grande diversité aussi bien au niveau structural (une ou plusieurs espèces de micro-organismes au sein du biofilm, épaisseurs diverses) qu'au niveau des supports colonisés, Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes (Tolker, 2000).

Les biofilms peuvent se former sur des surfaces, biologiques ou inertes, d'une grande diversité : tissus vivants, appareillage médical (sonde, cathéter, broches...), système de canalisation industriel ou d'eau potable, surfaces immergées, Les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm. Selon le type de support sur lequel se forme le biofilm, l'organisation structurale de ce dernier sera différente. Un biofilm fixé dans la lumière d'une canalisation a une structure très complexe, et contient divers composants : produits issus de réactions de corrosion, boue, algues unicellulaires et bactéries filamenteuses. Un biofilm formé à la surface d'un cathéter a une organisation plus simple : on distingue des micro-colonies de coques associées à une matrice d'exopolymères (Donlan, 2002).

Tous les biofilms n'ont pas la même épaisseur. Les biofilms des eaux naturelles oligotrophes sont plus fins que ceux des milieux aqueux riches comme la plaque dentaire ou les cathéters. Les biofilms récemment formés sont souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens qui sont stratifiés (Bury-Moné, 2007).

➤ Le biofilm est un environnement hétérogène

Le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physico-chimiques. Ainsi, contrairement aux cultures classiques réalisées en milieux liquides agités, le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (Costerton *et al.*, 1994).

La présence d'une espèce de micro-organisme ou d'une autre au sein du biofilm dépend des conditions environnementales. Par exemple, les biofilms éclairés par la lumière du soleil sont composés majoritairement d'organismes phototrophes, comme les algues ou les cyanobactéries, réalisant la photosynthèse et produisant leur biomasse à partir de carbone minéral. Les biofilms formés en absence de lumière sont constitués principalement de bactéries hétérotrophes (dégradation de la matière organique) et chimiotrophes (transformation de substances minérales) (Wanner, 2006).

Cette hétérogénéité physico-chimique s'accompagne d'une hétérogénéité métabolique, source de microenvironnements qui permet la coexistence organisée d'espèces bactériennes aux propriétés métaboliques différentes et souvent complémentaires. Il en résulte une répartition biologique organisée de nombreux microorganismes dans le biofilm où peuvent cohabiter bactéries, champignons, algues et protozoaires (Costerton *et al.*, 1994). La diversité des biofilms constituerait l'un des éléments clés dans leur robustesse face aux agents antimicrobiens et autres agressions (Singh *et al.*, 2002)

➤ Propriété des microorganismes en biofilm

Les microorganismes des biofilms possèdent des phénotypes différents des microorganismes planctoniques. Entre 3 et 50% du total des protéines chez les bactéries des biofilms est changé par rapport à celui des cellules en suspension. (O'Toole *et al.*, 2000). Par conséquent, les microorganismes au sein d'un biofilm possèdent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques comme la disparition des flagelles, la synthèse d'exopolymères, la mise en place d'un système de communication chimique quorum sensing qui n'est pas uniquement liés à la densité cellulaire mais aussi à la localisation spatiale des cellules (Costerton *et al.*, 1995). Des vésicules membranaires permettant le transport entre les cellules, de molécules comme l'ADN, et des molécules de signalisations et des protéines, ont également été trouvées (Stewart., 2002). Le biofilm permet aux bactéries de résister aux agents antimicrobiens et aux stress environnementaux (déshydratations, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets (Parot., 2007).

4.3. Composition du biofilm chez *S. aureus*

Les biofilms ont généralement des teneurs élevées en exopolymères qui les composent de 50 à 90%; [(Christensen *et al.*, 1990) ; (Nielsen *et al.*, 1997)]. Le contenu de la matrice peut varier d'un organisme à un autre, mais ce sont généralement des polysaccharides et des protéines (Sutherland, 2001).

ainsi que leurs combinaisons [(glycoprotéines) (Humphrey *et al.*, 1979) ; Qui sont majoritaires. On y trouve également des acides nucléiques et des alginates comme dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Mai *et al.*, 1993). Les teneurs en protéines dans les biofilms provenant de réseaux d'assainissement sont beaucoup plus élevées que celles en polysaccharides (Miqueleto *et al.*, 2010). La composition des EPS en sucres et en protéines dépend de l'alimentation [(Comte *et al.*, 2007) ; (Alnnasouri *et al.*, 2010)].

Les biofilms sont une communauté microbienne dans lequel les microbes produit une substances polymériques extracellulaires (EPS) tels que protéines (< 1-2 %) y compris les enzymes), ADN (< 1 %), polysaccharides (1-2 %) et l'ARN (< 1 %) et en plus de ces éléments, l'eau constitue la plus grande partie du biofilm, qui permet la circulation des éléments nutritifs à l'intérieur de la matrice du biofilm (Jamalet *et al.*, 2015), et des déchets du métabolisme cellulaire ,débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaire) [(Brangeret *et al.*, 2007) ; (Bellifa, 2014)]. Un biofilm est approximativement constitué de 90% de matrice extracellulaire d'exopolymères et de 5% de microorganismes (Bellifa, 2014).

➤ La matrice extracellulaire

Il a été montré qu'un polysaccharide extracellulaire « poly-β(1,6)-N-acétyl-D-glucosamine» (PNAG) également nommé PIA (for Polysaccharide Interacellular Adhesin) qui associé aux acides téichoïques et aux protéines staphylococciques forme ce qu'on a longtemps appelé « slime », et était l'un des constituants majeurs de la matrice d'EPS des biofilms de *S. aureus* [(Fowler *et al.*, 2001) ; (Fitzpatrick *et al.*, 2006) ;(Tu Quoc *et al.*, 2007)].

➤ La matrice extracellulaire d'exo-polymères

Est principalement constituée d'eau (97%) et incluse également des polymères d'EPS, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. 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) ; (Fitzpatrick *et al.*, 2006) ; (Tu Quoc *et al.*, 2007)].

Ce PIA est synthétisé par des enzymes codées par l'opéron ica ADBC retrouvé dans la plupart des souches de *S. aureus* cliniques [(Fowler *et al.*, 2001) ; (Fitzpatrick *et al.*, 2006) ; (Tu Quoc *et al.*, 2007)].

Cependant, des études récentes ont mis en évidence que ce polymère PIA n'était pas indispensable à la formation de biofilms pour toute souche de *S. aureus*. Ceci a été démontré aussi bien pour des souches cliniques ne produisant pas naturellement de PIA [(Fitzpatrick *et al.*, 2005) ; (O'Neill *et al.*, 2007); (Lauderdale *et al.*, 2009)]. Que pour des mutants de la synthèse du PIA (mutation du locus *ica*) (Boles *et al.*, 2008). Ces biofilms de *S. aureus* «ica indépendant » ne sont pas sensibles à l'action d'enzymes d'hydrolyse spécifiques du PNAG telle que la Dispersine B (Izano *et al.*, 2008), mais sont déstructurés par l'action de protéases [(Lauderdale *et al.*, 2010) ; (Marti *et al.*, 2011)]. Mettant ainsi en évidence que la matrice EPS de ces biofilms est de nature essentiellement protéique. Certaines protéines extracellulaires, présentes à la surface des enveloppes bactériennes ou excrétées dans la matrice EPS et pouvant être impliquées dans la formation des biofilms ont été identifiées, telles que la protéine A (Spa) (Merino *et al.*, 2009), FnBPA, FnBPB (O'Neill *et al.*, 2009), et SasG (Corrigan *et al.*, 2007). D'autres travaux ont montré que la formation des biofilms de *S. aureus* mettait en jeu de l'ADN extracellulaire [(Rice *et al.*, 2007) ; (Mann *et al.*, 2009)]. Cet ADN extracellulaire provient de la lyse cellulaire, elle-même contrôlée chez *S. aureus* par l'opéron *cid ABC*. En effet, une mutation au niveau du gène *cid A* réduit significativement la formation des biofilms de *S. aureus* (Rice *et al.*, 2007).

➤ Protection mécanique _ importance de la matrice

La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle de protection mécanique passive très important. Tout d'abord, elle protège les micro-organismes du biofilm de la dessiccation (Clutterbuck, 2007). Dans certaines conditions, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001). D'autre part, la matrice protège les micro-organismes de la dérive en les empêchant d'être emportés par le courant. Elle permet ainsi la colonisation de niches écologiques (Wanner, 2006).

La matrice assure aussi une protection mécanique des micro-organismes contre l'entrée dans le biofilm d'antiseptiques, de détergents et d'antibiotiques. La matrice crée un environnement protégé et assure la protection génétique des micro-organismes du biofilm et l'acquisition de caractères de résistance. L'organisation en communauté de micro-organismes au sein du biofilm est propice à l'échange d'informations, avec entre autres, la possibilité de transfert de caractères de résistance (Costerton, 1999).

➤ **Protection contre la destruction des cellules**

Des mutations génétiques au niveau de séquences codant pour les molécules du quorum sensing dans certains micro-organismes entraînent des changements de phénotypes et l'acquisition de caractères de résistance à la destruction physico-chimique des cellules (Tomlin, 2005).

D'autre part, les biofilms résistent mieux aux stress thermiques et à l'exposition aux rayons ultra-violet que les micro-organismes vivant sous forme planctonique (Martinez, 2007). Le mode de vie des micro-organismes sous forme de biofilm confère donc non seulement des avantages d'un point de vue métabolique, une protection mécanique, l'acquisition de caractères de résistance aux antibiotiques mais permet aussi l'acquisition d'une meilleure résistance aux rayons ultraviolets et aux hautes températures par rapport à leurs congénères planctoniques (Martinez, 2007).

5. Facteurs influençant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs qui peuvent être répartis en trois catégories : Les caractéristiques des surfaces à coloniser, les conditions environnementales, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), Les propriétés bactériennes (Branger *et al.*, 2007).

5.1 Caractéristiques de la surface

N'importe quelle surface en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm (Chalvet de Rochemonteix, 2009).

➤ **Géométrie de la surface**

La géométrie de la surface externe du support, à savoir sa forme tridimensionnelle, sa porosité, ses irrégularités de surface, détermine la localisation de l'adhésion bactérienne. (Campanac, 2002).

Les bactéries colonisent préférentiellement les supports poreux et se regroupent en général au niveau des aspérités, des ruptures de courbure, des coins. L'accumulation des biofilms à la surface des supports se réalise de fait dans les zones où la circulation des fluides environnants est freinée par les frottements sur les parois (Campanac, 2002).

S. aureus se lie à une grande variété de molécules du plasma (fibrinogène, fibrine...) et de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, vitronectine...) : les MSCRAMMs (**Foster et al., 1998**). Ces composés de surface servent de récepteurs aux protéines du plasma adsorbées à la surface du matériel médical (cathéters, prothèses...) expliquant ainsi la colonisation par *S. aureus* (**Navarre et al., 1999**). La formation de biofilm se produit aussi lors de l'infection de tissus par l'adhésion bactérienne aux molécules de la matrice extracellulaire de l'hôte (**Gotz, 2002**).

Parmi les MSCRAMMs, on trouve les protéines liant la fibronectine « Fibronectin Binding Protein » (FnBPA et FnBPB), la protéine liant le collagène (Cna), les protéines liant le fibrinogène (les « clumping » facteurs ClfA et ClfB), la protéine liant l'élastine « Elastin binding protein of *S. aureus* » (EbpS) et la protéine A (Spa) liant les immunoglobulines (IgG) (**Foster et al., 1998**). Ces protéines, exceptée EbpS, sont liées au peptidoglycane de la paroi de façon covalente grâce à un motif LPXTG (**Mazmanian et al., 2001**).

Les MSCRAMMs ont une organisation typique des protéines de surface et une organisation structurale assez similaire entre elles (Figure 5). Elles possèdent toutes une séquence signal (S) en N-terminale requise pour leur translocation vers la paroi via le système de sécrétion Sec. La partie C-terminale contient les régions hydrophobes d'ancrage dans la paroi (W) et dans la membrane (M), une séquence contenant le motif LPXTG qui s'insère entre les domaines W et M, et une queue de résidus chargés positivement. Les MSCRAMMs diffèrent entre elles par l'existence de différents domaines A, B, C, D, E et R correspondants à des répétitions de séquences et par la localisation de leur site de liaison auligand. (**Navarre et al., 1999**).

5. 2 Rugosité de la surface

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro colonies est importante (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques (**Donlan et al., 2002**).

La charge à la surface d'un solide peut engendrer des forces électrostatiques d'attraction ou de répulsion lors de l'approche de la bactérie. Les cellules bactériennes possèdent une charge négative sur leur membrane cellulaire mais cette charge est plus ou moins importante d'une souche à l'autre. La charge de surface du matériau peut être modifiée par le pH et la composition ionique de la solution environnante (**M'Hamedi, 2015**).

La rugosité et les propriétés chimiques d'une surface peuvent influencer l'attachement des bactéries et la formation d'un biofilm. La colonisation microbienne semble augmenter avec la rugosité de la surface (**Martinez *et al.*, 2007**).

En effet les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**).

5.3 Propriétés physico-chimiques de la surface

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces **hydrophobes et non polarisées** comme le Téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**).

la surface est le siège d'une absorption irréversible de macromolécules telles que des acides humiques, des polysaccharides ou des protéines, conduisant à la formation d'un film conditionnant ("conditionning film") [(**Little *et al.*, 1984**) ; (**Ishida *et al.*, 1990**)]. Ce film est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau ce qui a pour conséquence soit de prévenir l'approche des bactéries soit au contraire de créer un micro-environnement favorable à l'adhésion stable des bactéries.

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 [(**Briandet, 1999**) ; (**Krepsky *et al.*, 2003**)]. Les 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**)].

➤ Les 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 teichoïques et aux protéines [(**Sonohara et al., 1995**) ; (**Briandet, 1999**)]. Les acides teichoïques riches en groupements phosphate sont responsables de la charge négative de surface (cf. sections 4 et 5.2). Les protéines exposent leurs groupements chargés négativement (COO-) ou positivement (NH₃⁺) au niveau de la surface bactérienne résultant ainsi d'une charge globale négative, positive ou neutre. Ces protéines de surface interviennent dans des interactions dites acide-base de Lewis. Ce sont des interactions polaires entre les différents groupements des protéines, plus précisément entre des accepteurs et des donneurs d'électrons. Les interactions polaires sont principalement des liaisons hydrogène mais il existe des interactions secondaires appelées interactions hydrophobes.

L'hydrophobicité de la surface bactérienne peut être due aux acides lipoteichoïques et aux protéines de surface, comme la protéine A et l'autolysine/adhésine AtlE; [(**Ljungh et al., 1995**) ;(**Heilmann et al., 1997**)]. L'encapsulation est impliquée dans l'hydrophobicité de surface contrairement à la production d'exopolysaccharides comme le « slime » qui provoque une hydrophilie de surface chez les staphylocoques [(**Heinzelmann et al., 1997**) ; (**van der Mei et al., 1997**)]. Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, l'hydrophobicité de la surface bactérienne faciliterait la colonisation des cellules épithéliales ainsi que l'adhérence aux matériaux médicaux [(**Reifsteck et al., 1987**) ; (**Krepesky et al., 2003**)].

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 et al., 2002**).

➤ Les interactions électrostatiques

Peuvent varier en fonction de la force ionique d'un milieu. Ainsi, la présence de cations (surfaces cellulaires, supports) favorise l'étape d'adhésion entre surfaces chargées négativement (**Hermansson, 1999**).

5.4 Influence des conditions environnementales

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux [(Martinez, 2007) ; (Goller, 2008)].

➤ La température

Est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. 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).

Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion [(Hamadi *et al.*, 2004) ; (Boutaleb, 2007)].

➤ Composition du milieu

La composition du milieu nutritif tant au niveau qualitatif que quantitatif, est capable de moduler l'adhésion bactérienne. Ainsi la présence de calcium et de magnésium semble faciliter l'adhésion réversible de la bactérie à un support. La synthèse du slime est favorisée par un excès de carbone, une addition de glucose, ou une déplétion en nitrogène, potassium et phosphate (Baillif *et al.*, 2010).

La concentration en nutriments joue un rôle majeur : un milieu riche en substrats favorise l'adhésion et la croissance bactériennes. En cas d'appauvrissement du milieu environnant les bactéries encore planctoniques auront tendance à être attirées par le biofilm qui représente alors une réserve en substrats (Bellifa, 2014).

– Concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.

– **Sources de carbone disponibles** : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007).

– **Hydrodynamique du fluide** : Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux

laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (**Donlan, 2002**).

5.5. Présence de films protéiques sur la surface

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

La nature de ces films protéiques est différente selon les milieux. Les bactéries formant le biofilm de la plaque dentaire se fixent sur un film protéique, présent à la surface de l'émail dentaire et composé de lysosymes, de glycoprotéines et de lipides (**Donlan, 2002**).

La présence d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à cette surface, et favorise la formation de biofilms (**Bellifa, 2014**).

5.6. Propriétés 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 (**Donlan, 2002**).

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 avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées.

Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**). La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules

(stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de Phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate, fer et croissance ralentie (**Goller, 2008**).

6. Régulation de la formation de biofilm

6.1 Le quorum sensing

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing. C'est le phénomène de comportement communautaire « Biofilm » où les bactéries communiquent entre elles, en permettant de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire [(**Djalloul et al., 2010**); (**Pecastaings, 2010**)].

Il s'agit de mécanismes de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes, on parle de mécanismes de perception du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique [(**Costerton, 1999**) ; (**Tomlin, 2005**)]. Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques [(**Clutterbuck, 2007**) ; (**Irie, 2008**)].

Ou il y a une activation de la production des gènes cibles, cela induit la réponse correspondante aux signaux, comme la production d'Exo-polysaccharides (EPS) [(**Allnasouri, 2010**) ;(**Pecastaings, 2010**)].

La nature et la fonction des molécules signalant les échanges de cellule-à-cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (**Costerton, 1999**). Des mutations de gènes impliqués dans les mécanismes de quorum sensing entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome¹³ et du protéome¹⁴, avec en particulier un contrôle de l'expression de facteurs de virulence comme les protéases par exemple (**Tomlin, 2005**). Les molécules du quorum sensing sont variées, et diffèrent d'une espèce bactérienne à une autre.

6.2 Les molécules du quorum sensing

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries [(Parsek, 2004) ;(Irie, 2008)]. On trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram-négatives. La majorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides auto-inducteurs, dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du quorum sensing sont dégradées par des enzymes : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (Irie, 2008).

6.3 Rôle du quorum sensing

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm. Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm, Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (Iriet *et al.*, 2008). Il implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signal appelées des auto- inducteurs (AI). Chez les bactéries à **Gram négatif**, l'auto- inducteur est un **protéine R**. La majorité des molécules signals sont **des N-acyl L-homosérine lactones ou homosérine lactone (HSL)** qui s'accumulent dans le milieu avec la croissance bactérienne et se fixent à la surface de la cellule sur un récepteur de la **protéine R** qu'il active pour la transcription de gènes qui diminue la mobilité, induisant des modifications de phénotypes cellulaires à l'origine de la formation du biofilm, alors que chez les **bactéries à Gram positif**, c'est un oligopeptide appelé **phéromone (Dvies et al., 1998)**.

6.4 Altération du quorum sensing

L'altération des mécanismes de quorum sensing peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou encore des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (Irie, 2008). Les biofilms mutants pour les molécules du quorum sensing ont une structure tridimensionnelle déficiente. Par exemple, les mutants de *Burkholderia cenocepacia* pour les

molécules du quorum sensing sont toujours capables de se fixer à une surface mais l'organisation spatiale des cellules est altérée de façon drastique ; de plus, on constate une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques de ces bactéries pendant la phase de croissance du biofilm **(Tomlin, 2005)**. Des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* mutantes pour les molécules du quorum sensing sont moins résistants à l'action de la tobramycine, du peroxyde d'hydrogène et des macrophages **(Burmolle, 2006)**.

7. Les biofilms dans le domaine médical

En médecine, les biofilms ont une importance particulière car ils sont impliqués dans un large éventail d'infections chez l'homme. Environ 65 % des infections sont dues à des biofilms dans les pays dits développés. Les biofilms sont aussi impliqués dans 60 % des infections nosocomiales et dans toutes les infections prothétiques **(Costerton et al., 1995)**.

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms **[(Hall Stoodley et al., 2004)]**.

Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, pacemakers, cathéters de dialyse péritonéale, sondes de tympanostomie, sondes urinaires, prothèses vocales). 82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés **(Archibald et al., 1997)**.

Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* **(Costerton et al., 1999)**.

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants). Cette résistance accrue, multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène.). elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus, La résistance élevée des biofilms aux agents anti-bactériens pourrait également reposer sur la présence d'une sous-population de

bactéries résistantes, capables de résister à de fortes concentrations d'antibiotiques (**Lewis, 2005**).

Les staphylocoques sont responsables de la grande majorité des infections causées par des biofilms. Ils sont présents en grand nombre dans la flore commensale de la peau et des muqueuses chez l'Homme et l'animal (**Otto, 2008**). Les infections associées à la présence de biofilms de *Staphylococcus aureus* sont plus difficiles à traiter et nécessitent un remplacement plus fréquent des implants médicaux que celles associées aux biofilms de *Staphylococcus epidermidis* (**Jones, 2001**). Les staphylocoques ne forment pas de biofilms avec d'autres espèces bactériennes. Il est rare de trouver plus d'une souche bactérienne au sein d'un même biofilm. Ceci pourrait s'expliquer par des mécanismes de quorum sensing spécifique des staphylocoques qui inhiberaient l'expression des facteurs de virulence d'autres bactéries (**Arciola, 2005**). Une voie de recherche pourrait être d'abaisser la virulence de ces biofilms de staphylocoques. Par exemple, plutôt que de les détruire, les rendre hétérogènes permettrait de rebasculer vers un écosystème plus proche de la normale, Les cathéters veineux centraux sont les implants médicaux les plus à risque par rapport au développement d'une infection nosocomiale (**Klevins, 2005**). Ceci pose de graves problèmes de santé publique puisque les traitements systémiques de routine des patients atteints d'infections de ce type se révèlent le plus souvent inefficaces (**Donlan, 2008**).

Les micro-organismes en cause proviennent de la flore cutanée du patient, de la micro-flore exogène du personnel hospitalier, ou encore d'environnements contaminés. Les micro-organismes atteignent le cathéter par migration à partir de la peau le long de la partie externe du cathéter. Les micro-organismes les plus fréquemment isolés sont *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae* (**Donlan, 2008**).

La liste suivante, non exhaustive, regroupe les principales infections liées à la présence de biofilms (**Lewis, 2008**).

➤ **Infections ou maladies :**

- Caries dentaires,
- Gingivites,
- Péritonite,

- Mucoviscidose,
 - Otite moyenne (notamment chez l'enfant),

 - Ostéomyélites,
 - Prostatites
- **Infections nosocomiales :**
- Sutures,
 - Lentilles de contact
 - Port d'un implant médical : Sonde urinaire, Cathéter veineux central, Sonde endotrachéale, Sonde de gastrotomie, Valve cardiaque artificielle, Prothèse orthopédique, Broches (ostéomyélite).

MATÉRIEL ET MÉTHODES



Partie II. Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie et de chimie, Université Dr Moulay Tahar Saida.

2. Matériel biologique

2.1 Souches bactériennes

Les souches de *Staphylococcus aureus* utilisées dans cette étude nous ont été aimablement fournies par l'équipe des extrêmophiles du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE) de l'Université de Tlemcen.

Il s'agit de :

deux souches cliniques, LMB20327 (A1) et LMB20330 (A2) (**Ghellai *et al.*, 2014**) ; deux souches de référence, Sa113 (ATCC35556) productrice de biofilm et Ica non productrice de biofilm (**Cramton *et al.*, 1999**).

2.2. Revivification des souches

Les souches utilisées ont été inoculées dans du bouillon nutritif (BN) en tube de 5ml puis incubées pendant 24h à une température de 37°C. Les suspensions bactériennes obtenues étaientensemencées par stries transversales sur milieu de Chapman. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24h.

Cette étape était appliquée afin de mettre en évidence toute contamination éventuelle.

2.3. Tests préliminaires d'identification

Les souches staphylococciques utilisées dans cette étude ont été soumises à une identification préliminaire portant sur quelques tests de la microbiologie classique. Pour ce faire nous avons procédé à une identification des souches par l'étude de leurs caractères macroscopiques et microscopiques en plus d'autres caractères supplémentaires.

2.3.1. Caractères macroscopiques

Toutes les caractéristiques macroscopiques ont été étudiées par l'examen à l'œil nu des colonies sur milieu sélectif de Chapman. Les critères étudiés portent sur la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies. Les souches étudiées ont été ensemencées par la méthode des quadrants sur milieu de Chapman puis incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

2.3.2. Caractères microscopiques

Les caractères microscopiques des souches utilisées portent sur l'étude de leur forme, leur mobilité, leur mode de groupement et leur type de Gram.

2.3.2.1. Examen à l'état frais

Le but de cet examen est la mise en évidence de la mobilité ou non des souches étudiées par l'observation microscopique à l'état vivant.

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile une partie d'une colonie bactérienne de 24h sur gélose nutritive est prélevée puis suspendue dans une goutte d'eau physiologique stérile, la suspension obtenue est observée entre lame et lamelle au microscope optique à un grossissement x40.

2.3.2.2. Examen à l'état coloré (Coloration de Gram)

Cet examen qui correspond à une coloration différentielle permet de mettre en évidence le type de gram des souches étudiées, leur forme ainsi que leur mode de groupement cellulaire.

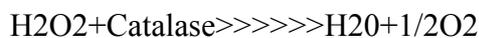
La coloration de Gram est effectuée à partir des colonies cultivées sur gélose au sang cuit présentant l'aspect caractéristique du staphylocoque. Aussi, elle peut être réalisée à partir du milieu de Chapman, pour confirmer la présence de cocci en diplocoques et en grappes de raisin.

2.3.3. Autres caractères

2.3.3.1. Recherche de la catalase

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques. A partir d'un isolement, une petite quantité de culture bactérienne est prélevée; puis placée sur une lame, on fait réagir la colonie dans 1 goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Garnier et Denis, 2007**).

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène), la réaction se fait selon l'équation :



2.3.3.2. Test coagulase

La coagulase libre est présente chez *S. aureus* mais aussi peut être produite par *S. intermedius* ou *S. hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur. La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0.5ml de plasma humain et 0.5 ml d'une culture de staphylocoques de 24 h en bouillon. Le mélange est placé à l'étuve à 37°C et est incubé pendant 24 heures. Les souches de *S. aureus* provoquant la coagulation du plasma le plus souvent les trois premières heures, Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum (**Garnier et Denis, 2007**).

2.3.3.3. Test oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semiquinonique rose violacé. L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl-1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche du cytochrome

Oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes ; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes.

2.3.3.4. Test Pastorex

Pastorex staph plus est un test rapide d'agglutination sur lame pour la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène (clumping factor), de la protéine A, et des polysaccharides capsulaires de *staphylococcus aureus*.

La capacité du réactif Pastorex staph plus à reconnaître les polysaccharides capsulaires de *staphylococcus aureus*, lui permet d'identifier avec une très grande sensibilité aussi bien les souches de *staphylococcus aureus* sensibles à la méticiline, que les souches résistantes à la méticiline, qui sont de plus en plus souvent responsables d'infections nosocomiales graves [(Boutonnier *et al.*, 1989) ; (Freney *et al.*, 1989)].

2.4. Conservation des souches

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu favorables pour leur multiplication).

3. Techniques d'évaluation de la formation de biofilm in vitro

Il existe plusieurs méthodes pour mettre en évidence la production de biofilm, on peut citer notamment :

- Culture sur plaque avec coloration au cristal violet (TCP : Tissue Culture Plate), méthode considérée comme étant la technique de référence,
- Méthode en tube (TM) qui utilise un milieu trypticase-soja au lieu des plaques,
- Méthode au Rouge Congo Agar (RCA)
- Observation en microscopie électronique
- Biofilm Ring Test®, méthode récente qui a l'avantage d'être automatisable.

Selon le matériel disponible dans le laboratoire, nous avons retenu la méthode en tubes (TM). Cependant cette méthode a un temps de mise en œuvre important et ses résultats sont parfois variables (problème de reproductibilité).

4. Méthode en tubesTM

C'est une technique décrite en 1982 par Christensen qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm.

A partir d'une culture jeune de 24h, une colonie estensemencée dans 10ml d'un milieu liquide (bouillon BHIB ou bouillon nutritif).Après incubation à 37°C pendant 24h les tubes sont lavés 4 fois avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,3) puis séchés. à T° ambiante pendant 15min. Les tubes sont ensuite remplis avec 3ml cristal violet (0,1%). Après 15 minutes, les tubes sont vidés puis lavés trois fois consécutives avec du PBS. 3ml d'éthanol (95%) est ajouté dans chaque tube. La lecture des résultats est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630nm.

La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le bas du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. **(Stepanovic et al, 2000).**

5. Effet du pH sur la formation de biofilm chez *S. aureus*

A partir d'une culture jeune de 24h, une colonie estensemencée dans 6ml d'un milieu liquide (bouillon BHIB ou bouillon nutritif).Après incubation à 37°C pendant 24h versé 0.1ml de cette suspension dans des tubes en verre contenant 3ml de bouillon nutritif à différentes concentration de pH **(5, 7 et ; 9)**. On a utilisé trois tubes pour chaque concentration.

Après 24 heures d'incubation, la capacité de la formation du biofilm est également testée par la méthode TM décrite ci-dessus

6. Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez *S. aureus*

A partir d'une culture jeune de 24h, une colonie estensemencée dans 6ml d'un milieu liquide (bouillon BHIB ou bouillon nutritif). Après incubation à 37°C pendant 24h versé 0.1ml de cette suspension dans 9 tubes en verre contenant 3ml de bouillon nutritif. Les tubes

Ont été incubés à 37°C pendant des temps différents (24h, 48h et 72h). On a utilisé trois tubes pour chaque temps d'incubation.

Après les temps d'incubation, la capacité de la formation du biofilm est testée par la méthode TM décrite ci-dessus.

RÉSULTATS ET DISCUSSION



Partie III. Résultats et Discussion

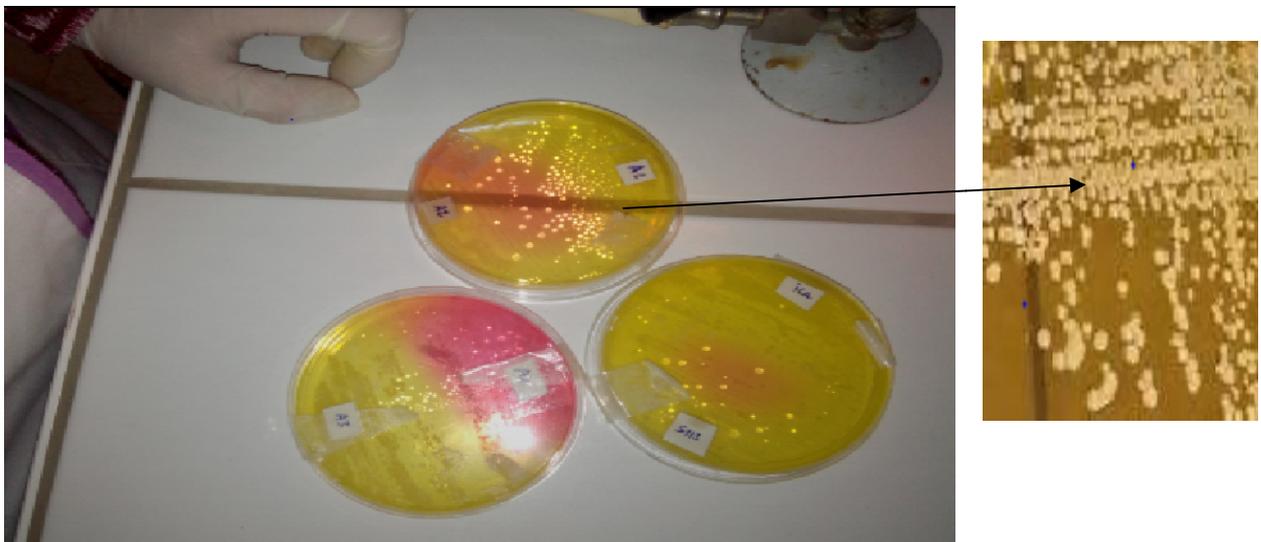
1. Résultats de l'identification préliminaire

Les souches cliniques, LMB20327 (A1) et LMB20330 (A2) ainsi que les souches de référence, Sa113 (ATCC35556) et Ica ont été revivifiées. Après avoir été incubées dans du bouillon nutritif pendant 24h à 37°C, elles ont étéensemencées dans le milieu de Chapman puis incubée pendant 24h à 37°C. Les colonies obtenues pour chacune des 4 souches ont été soumises à des examens macroscopiques et microscopiques

1.1. Caractères macroscopiques

Les colonies obtenues sur milieu de Chapman sont pigmentées et entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol (figure 8). Le milieu de Chapman contient un indicateur coloré (rouge de phénol), la dégradation du mannitol est repérée par le virage de la couleur du rouge vers le jaune.

Les colonies sont arrondies à bords régulier de petite taille de 1 à 2 mm de diamètre.



Figures 8: Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu de chapman

1.2. Caractères microscopiques

Coloration de Gram

La coloration de Gram des colonies isolées sur milieu de Chapman, nous a permis d'observer à l'aide du microscope optique le type de Gram. Toutes les souches testées sont des cocci Gram positif ayant un mode de groupement en grappe de raisin (Figure 9 à 12).

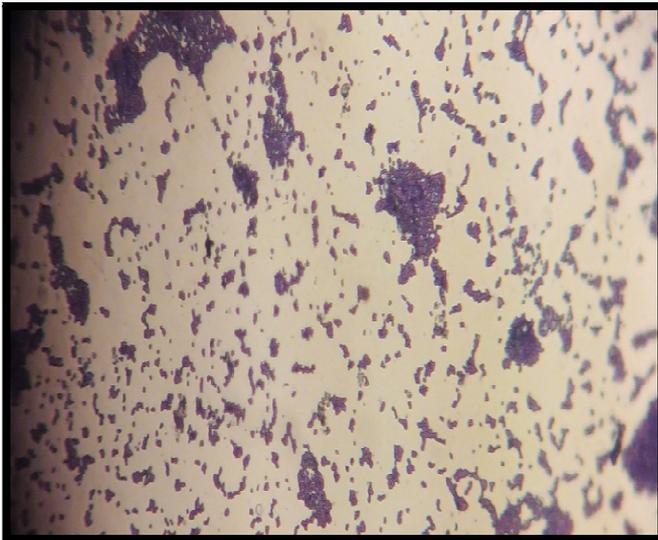


Figure 9 : Observation microscopique de la souche A2 après coloration de Gram. Grossissement x100

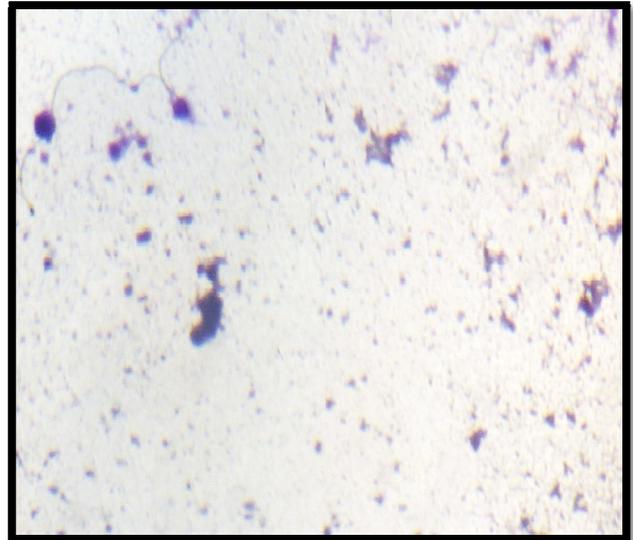


Figure 10 : Observation microscopique de la souche A1 après coloration de Gram. Grossissement x100

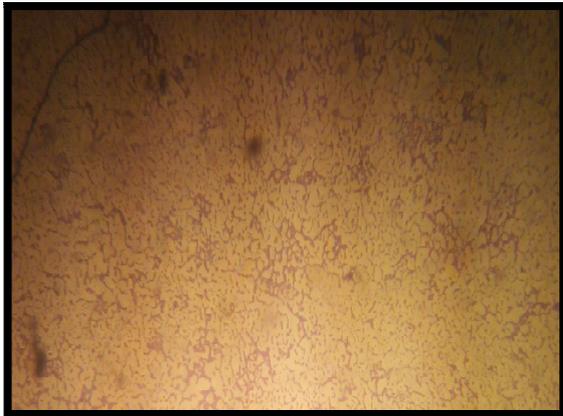


Figure 11 : Observation microscopique de la souche Sa113 après coloration de Gram. Grossissement x100

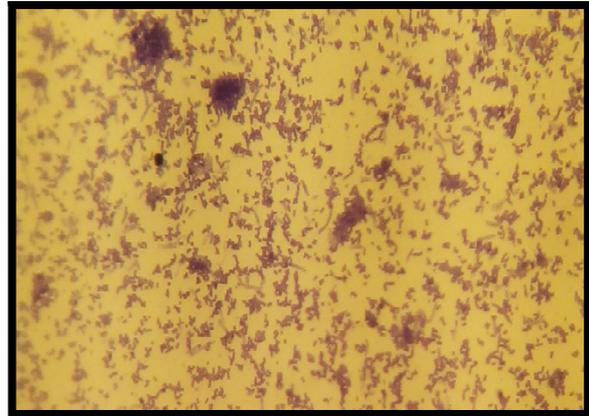


Figure 12 : Observation microscopique de la souche Ica après coloration de Gram. Grossissement x100

1.3. Test catalase

Le test de catalase étaient positifs pour étudiées toutes les souches A1, A2, Sa113 et Ica (figure 13).



Figures 13: Test de catalase chez les souches A1 et Sa113

1.4. Test oxydase :

Les Staphylococcus étaient dépourvues d'oxydase et il n'y a pas eu de coloration, donc elles sont oxydase négative (figure14).



Figure 14 : test de l'oxydase : résultat négatif

1.5. Test de coagulase libre

S. aureus est le représentant majeur coagulase positive ayant un rôle déterminant en pathologie humaine. Néanmoins, le test de coagulase peut être soumis à un certain nombre de variations qui peuvent influencer les résultats (Myrick et Ellner, 1982). Les souches utilisées dans cette étude se sont toutes avérées coagulases positives (figure 15) ce qui confirme d'autant plus leur appartenance à l'espèce *Staphylococcus aureus*.



Figure 15 : Test de coagulase : résultat positif

1.6. Test Pastorex ou d'agglutination

Le test d'agglutination au latex consiste à la mise en évidence du récepteur au fibrinogène (clumping factor), la protéine A et l'antigène de capsule. Les résultats du test d'agglutination au latex (Figure 16) sont avérés positifs pour toutes les souches testées dans cette étude.

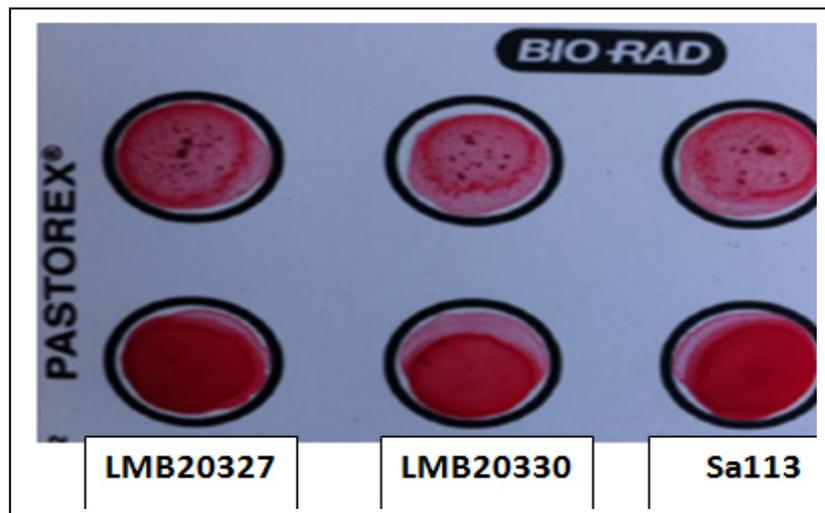


Figure 16 : Test Pastorex 'Staph-Plus latex agglutination'

2. Effet du pH sur la formation des biofilms chez *S. aureus*

La formation de biofilm est un phénomène complexe qui est soumis à l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels on peut citer la surface à coloniser, le milieu environnant, les paramètres physicochimiques et les microorganismes (Branger *et al.*, 2007).

Afin d'étudier l'influence du pH du milieu de culture sur la formation de biofilm à *S. aureus*, le bouillon nutritif utilisé dans cette expérimentation était préalablement calibré à différents pH puis inoculé par les souches étudiées selon le protocole précité.

Les valeurs de pH sélectionnées sont : **pH 5** (acide), **pH 7** (neutre) et **pH 9** (basique). Les expériences ont été menées sur deux souches cliniques de *S. aureus* **LMB20327 (A1)** et **LMB20330 (A2)**. Les souches **Sa113 ATCC35556** et **Ica** ont été utilisées comme souches de référence ; la première étant biofilm positif tandis que la deuxième est biofilm négatif.

Les résultats de l'effet du pH sur la production de biofilm chez les souches testées sont représentés par les figures 17 et 18.

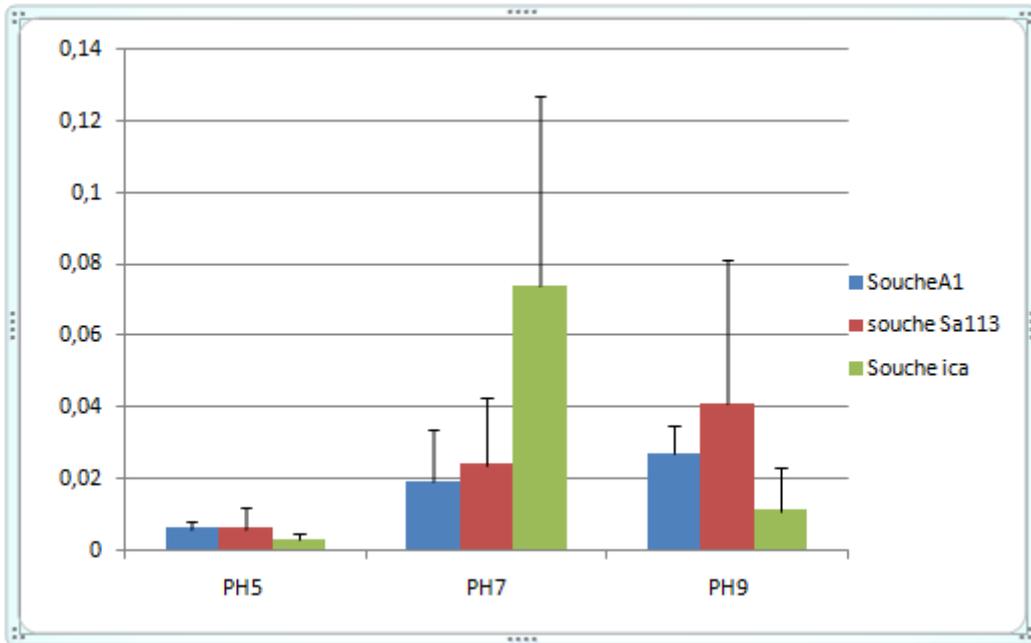


Figure 17 : Effet du pH sur la formation de biofilm chez les souches LMB20327 (A1) , Sa113 et Ica

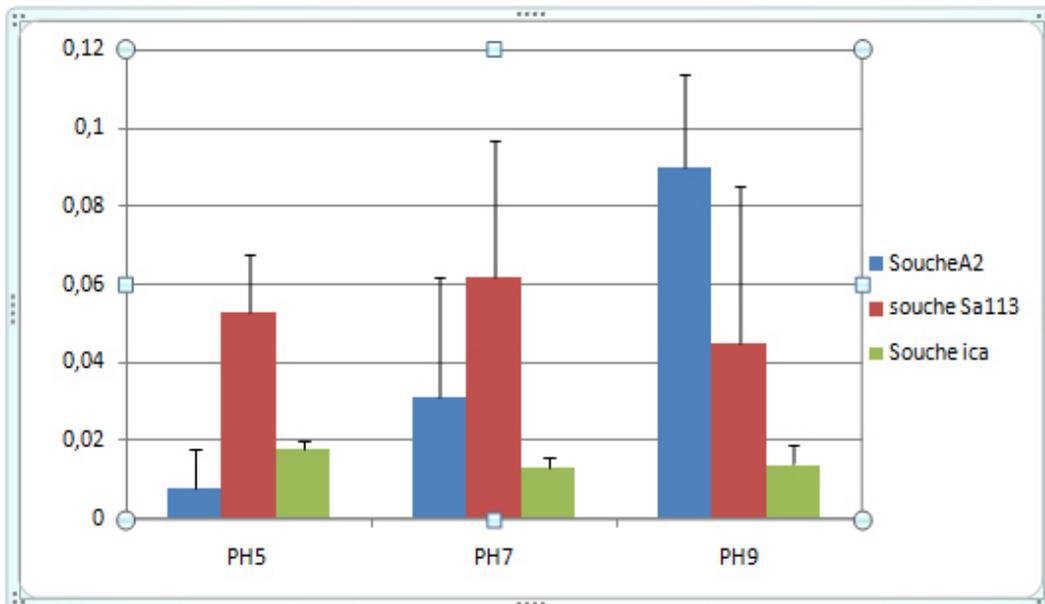


Figure 18 : Effet du pH sur la formation de biofilm chez les souches LMB20330 (A2) , Sa113 et Ica

La production de biofilm in vitro dépend d'un certain nombre de facteurs physiques et chimiques, tels que la composition du milieu de culture, température, pH, oxygène, etc. [(Harjai *et al.* 2005) ; (Di Bonaventura *et al.*, 2007) ; (Hošťacká et Čížnár, 2007)].

Le but de cette partie de travail est d'étudier l'impact du pH sur la formation de biofilm chez des souches de *S. aureus*. En effet, des suspensions bactériennes à différents pH (**pH5**, **pH7** et **pH9**) ont été préparées dans le bouillon nutritif à partir des cultures jeunes sur gélose nutritive. Après 24 heures d'incubation, la capacité de la formation du biofilm a été également testée par la méthode de **TM**. Les résultats obtenus, illustrés dans les **figures 17 et 18** ont permis de mettre en évidence plusieurs comportements selon les souches à différents pH.

Il semble que le pH a un effet significatif sur la formation de biofilm chez les souches testées. Plus le pH augmente plus la production de biofilm est importante chez les souches LMB20327, LMB20330. Par ailleurs, chez la souche Sa113 les résultats étaient variables ; dans le deuxième essai de l'expérimentation (figure 18) le taux maximal de production de biofilm était obtenu à pH neutre (pH 7).

Il est connu que la souche Ica ne produit pas de biofilm. Cependant, selon les résultats obtenus dans cette étude on note la présence de biofilm chez cette souche. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la méthode en tubes (TM) est non reproductible et peu fiable. Notre choix a porté sur la méthode en tubes en raison du matériel disponible dans le laboratoire.

En effet, la production de biofilm chez les bactéries nécessite l'union d'une multitude de conditions optimales parmi lesquelles le pH du milieu de culture. Selon une étude réalisée par **Hamadi *et al.* (2012)**, ils ont montré que le phénomène d'adhérence quantitative de *S. aureus* au verre est largement affecté par le pH du milieu.

Malgré la facilité de la technique TM, la lecture des résultats obtenus par celle-ci peut-être difficile surtout si l'observateur n'est pas familiarisé avec cette technique. Cette différence se situe particulièrement dans l'interprétation des réactions faibles ou absentes (**Stepanovic *et al.*, 2000**). Par conséquent, et en accord avec des études précédentes, la méthode TM ne peut pas être recommandée pour la détection de la formation de biofilms [(Christensen *et al.*, 1982) ; (Mathur *et al.*, 2006)].

3. Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez *S. aureus*

Les résultats de l'effet du temps d'incubation sur la production de biofilm chez les souches testées sont représentés par les figures 19 et 20.

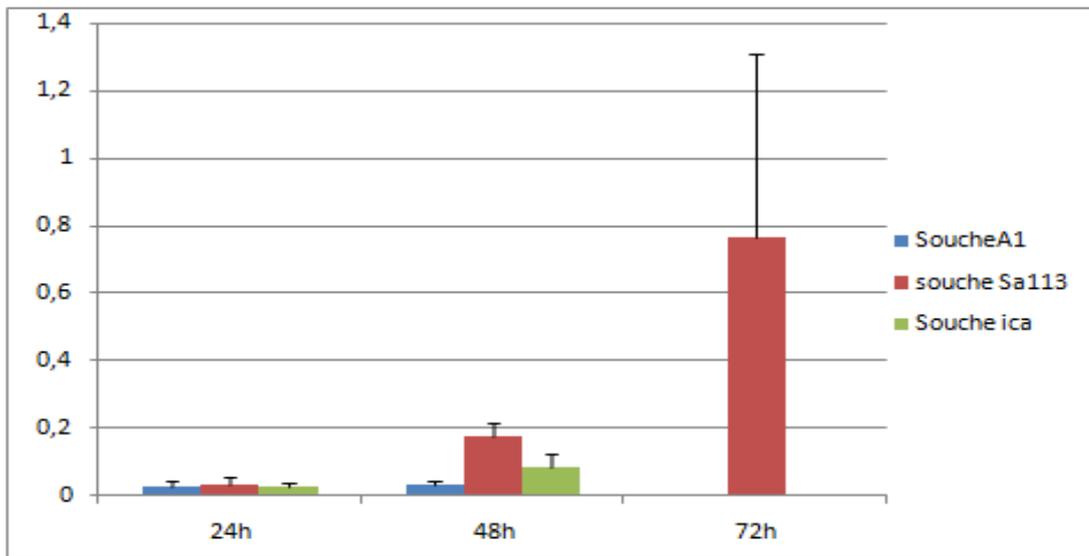


Figure 19 : Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez les souches LMB20327 (A1), Sa113 et Ica

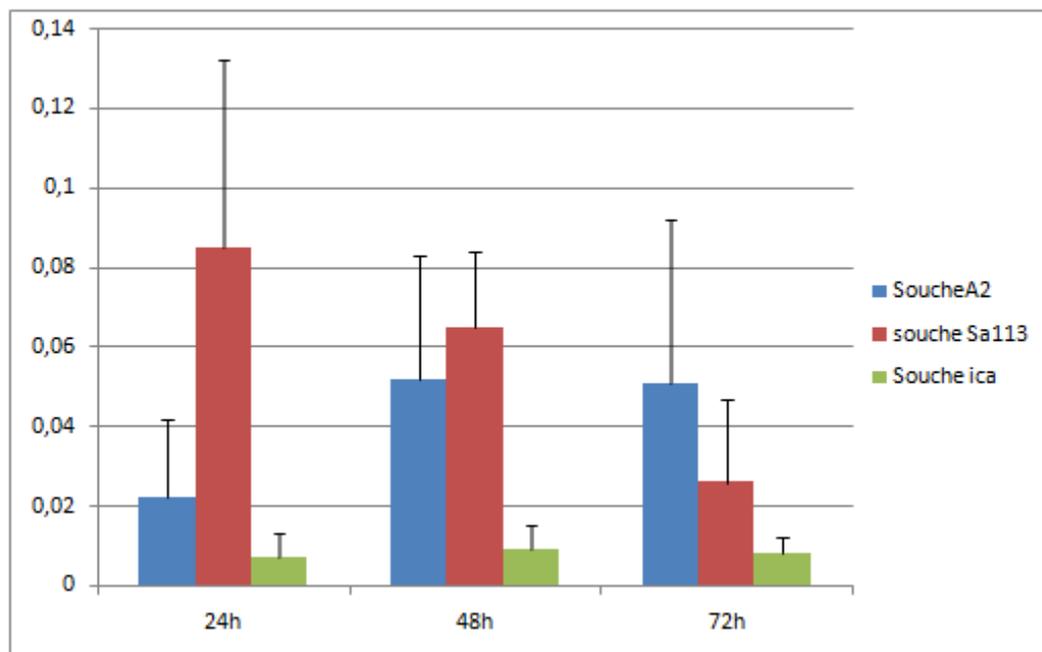


Figure 20 : Effet du temps d'incubation sur la formation de biofilm chez les souches LMB20330 (A2), Sa113 et Ica

Selon les résultats obtenus dans cette étude, la souche LMB20327 semble exprimer un taux faible de biofilm après 24h et 48h, ce taux nul après 72h d'incubation. Cependant, la souche LMB20330 après 48h d'incubation produit une quantité de biofilm environ deux fois supérieure que celle produite à 24h ; cette quantité reste stable même après 72h d'incubation.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans une étude réalisée par **Oliveira et al. (2007)** qui montrent que chez *S. aureus* il y a une différence significative entre le biofilm formé après 24h et celui de 48h ($p < 0.05$) ; chez *S. epidermidis* aucune différence significative n'existe entre le biofilm de 48h et celui de 72h.

En effet, plus le temps de contact augmente plus les bactéries ont assez de temps pour se fixer et former un biofilm sur la surface du dispositif (**Mączyńska et al., 2010**). Par ailleurs, selon une étude réalisée par **Abdallah et al. (2014a)** il a été prouvé que l'augmentation de la température et de la durée d'incubation sont proportionnelles à l'adhésion de *S. aureus* à l'acier inoxydable et au polycarbonate. D'autres études portant sur l'effet de ces paramètres sur l'adhésion de *S. aureus* sont en accord avec cette hypothèse (**Abdallah et al., 2014b**).

En réalité, il est difficile de conclure sur l'effet de la durée d'incubation sur la formation de biofilm. Plusieurs paramètres doivent être pris en considération tels que la température d'incubation, la composition exacte du milieu de culture, la nature de la surface étudiée. De plus, la technique utilisée pour mettre en œuvre et détecter la production de biofilm est plus qu'importante.

CONCLUSION



Conclusion

Au cours de notre étude nous avons pu effectuer quelques tests préliminaires afin de réidentifier les deux souches cliniques de *S. aureus* (LMB20327 et LMB20330) qui nous ont été fournies par l'équipe des extrêmophiles du laboratoire LAMAABE. Les souches testées ainsi que celles de référence sont des cocci immobiles, Gram positives regroupées en grappes de raisin, catalase (+), oxydase (-), coagulases (+).

Les souches étudiées ont été testées pour leur aptitude à former le biofilm par la méthode en tubes (TM).

Le pH avait un effet significatif sur la formation de biofilm chez les souches testées. Plus le pH augmente plus la production de biofilm est importante chez les souches LMB20327, LMB20330. Par ailleurs, chez la souche Sa113 les résultats étaient variables ; dans le deuxième essai de l'expérimentation le taux maximal de production de biofilm était obtenu à pH neutre (pH 7). Cependant, selon la présente étude on note la présence de biofilm chez la souche Ica qui est normalement biofilm négatif.

La souche LMB20327 exprime un taux faible de biofilm après 24h et 48h, ce taux était nul après 72h d'incubation. Cependant, la souche LMB20330 après 48h d'incubation produisait une quantité de biofilm environ deux fois supérieure que celle produite à 24h ; cette quantité restait stable même après 72h d'incubation.

A l'issue de cette étude et à cause des résultats variables qui ont été obtenus, nous pouvons confirmer que la méthode en tubes (TM) ne peut être recommandée dans ce genre d'étude. Par conséquent, l'effet du pH du milieu ainsi que la durée d'incubation sur la formation de biofilm à *S. aureus* est contestable.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**



Références

A

- Almeida J, Jorgensen JH, Johson JE (1993).** Evaluation of the Auto microbie system gram positive. Identification of coagulase negative staphylococci. *J. Clin Microbiol*, 18 (2) : 438.
- Abdallah M, Chataigne G, Ferreira-Theret P, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib N-E (2014b)** Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 2597–2607.
- Abdallah M, Chataigne G, Ferreira-Theret P, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE (2014a).** Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(6): 2597-607.
- Allignet J, Aubert S, Dyke KG, Solh N (2001).** *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infect Immun*. 69, 712-718.
- Allison DG, Ruiz B, et al (1998).** «Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms." *FEMS Microbiol Lett* 167(2): 179-184
- Alnasouri M, Dagot C, Pons MN (2010a).** Les polysaccharides et les polyprotéines de biofilm. Séminaire de l'école doctorale Ressources Procédés Produits (RP2E)-Nancy, France.
- Aouati H (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthécillines: étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, algérie: thèse N° : 006 / SN / 2009.
- Archer GL, Bosilevae JM (2001).** Signaling antibiotic resistance in staphylococci. *Science*. 291: 1915-1916.
- Archibald LK, Gaynes RP (1997).** Hospital acquired infections in the United States: The importance of interhospital comparisons. *Nosocomial Inf.* 11: 245-255]
- Arciola CR, Campocia D, Ravaiolis, Mntanarol (2015).** Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 5:7. eCollection 2015. Review
- Arciola CR, An YH, Campocia D, et al (2005).** Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int. J. Artif. Organs*. 28: 1091- 1100.
- Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H (2003).** Bactériologie clinique. 3ème édition. ellipses, Paris. 8-28.

B

- Bilwes BA, Mourey L, Rifai S, Piémont Y, Moras D (1997).** The structure of bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 82, 204-209.
- Baillif S, Hartmann D, Freney J, Kodjikian L (2010).** Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du matériau. *Journal français d'ophtalmologie*. 33 : 210-221
- Baldellon F, M6graud (1985).** *Stomatococcus mucilaginosus*. Caractérisation de 100 souches isolées de la sphère ORL. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* 136A:213-226
- Bannerman TL, SJ, Peacock (2007).** *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive cocci. In *Manual of clinical microbiology* 9th edition (Murray, P. R., Baron,

- E. J, Jorgensen JH, Landry M L, Pfaller MA, Eds): 1 pp 390-411. ASM Press, Washington, DC, USA.
- Bellifa S (2014)**. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat en maîtrise du développement microbien. Université abou bekr belkaid, Tlemcen
- Bellon-Fontaine M-N, Rault J, Van Oss CJ (1996)**. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. In Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, pp.47-53.
- Beloin C, Roux A, et Svanborg C (2008)**. *Echerichia coli*, biofilms. Curr Top Microbiol Immunol 322: 249-289
- Bendinger B, Rijnaarts HH, Altendorf K, Zehnder AJ (2003)**. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Applied and environmental microbiology. 59(11): 3973-3977
- Berger-Bachi B (1994)**. Expression of resistance to methicillin. Trends Microbiol. 2: 389-393
- BIO-RAD (2007)**. Chapman - mannitol saït agar. www.afnor-validation.org
- Bismith R, Leclercq R (2000)**. *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. In : Précis de bactériologie clinique. (ed. Freyney JRF, Hansen W, Bollet C), ESKA, Paris. 611-918.
- Bohme RJ, Shuttleworth R, McNabb A, Colby WD (1996)**. Identification of Staphylococci with a self_educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. J Clin Microbiol. 34: 3075_3084
- Boles BR, Horswill AR (2011)**. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in microbiology* 19: 449-455.
- Borg MA, Kraker M, Scicluna E, et al (2007)**. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother ;60 (6):1310–1315. doi:10.1093/jac/dkm365
- Boutaleb N (2007)**. Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
- Boutonnier A, Nato F, Bouvet A, Lebrun L, AuDurier A, Mazie JC, Fournier JM (1989)**. Direct testing of blood cultures for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of *staphylococcus aureus*. J.clin. Microbiol. 27: 989-993.
- Boyd A, et AM, Chakrabarty (1995)**. "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide." J. Ind. Microbiol. 15: 162-168.
- Branger A, Richer M-M, Roustel S (2007)**. Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon ; p.131-164.
- Briandet R (1999)**. Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms. Aspects physico-chimiques, Thèse de Docteur de l'ENSAR - Mention Physico-chimie et Qualité des bioproduits, Rennes, France.
- BrOwn DF (2005)**. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin_resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Antimicrob Chemother. 2005,56: 1000_1018. doi:10.1093/jac/dki372
- Bury- Moné S (2007)**. Les biofilms. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.
- Busscher HJ, AH, Weerkamp, et al (1984)**. "Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion." Appl Environ Microbiol 48(5): 980-983.

C

- Campanac C (2002).** Biofilms bactériens : intérêts dans l'évaluation de l'activité détergente. Approche des facteurs impliqués dans la formation et la résistance finale. Thèse de l'université Paul Sabatier, Toulouse, France
- Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C (2002).** Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1469-1474,
- Capdeville B, Nguyen KM (1990).** Kinetics and modeling of aerobic and anaerobic film. *Wat Sci Tech.* 22: 149-170
- Caract- Res culturaux et biochimiques de 100 souches isolées de la sphl-re orl.** Laboratoire de Bacteriologic (Pr Ag. C. Bebear), Hdpital des En[anls, 33077 Bordeaux Cedex (France) 136 : 213-226
- Cashman JS, Smith CB, Weldner M, Matsen JM,** Evaluation of cost-effectiveness and rationale for use a selective culture plate for isolation of *Staphylococcus* from stool specimens *J. Clin. Microbiol,* 20 (3) : 570-571
- Cavarelli J, Prévost G, Bourguet W, Moulinier L, Chevrier B, Delagoutte (1997).** the structure of *Staphylococcus aureus* epidermolytic toxin A, an atypic serine protease, at 1.7Å resolution. *Structure* 5:813–824
- Chaalal W (2013).** Occurrence et profil d'antibioresistance des *Staphylococcus aureus* isolée de produits alimentaires. Université d'Es-senia Oran, Algerie
- Chadli I, et al (2014).** Dépistage du portage nasal de *Staphylococcus aureus* lors de l'admission des patients a l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V Rabat. *Journal Marocain des Sciences Médicales.*
- Chalvet de Rochemonteix A (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al (2003).** Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med.* 348: 1342-1347
- Cheng AG, MC Adow M, Kim HK, Bae T, Missiakas (2010).** DM,schneewind O .Contribution of Coagulases towards *staphylococcus aureus* Disease and protective immunity. Cheung A editor. *Plos pathog;*6 :e1001036.dol :10.1371/journal.ppat.1001036
- Cheng AG, Adow MC, Kim HK, Bae T, DM, Missiakas O, Schneewind (2010).** Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog.* 6: e1001036.
- Chmielewski , Frank (2003).** Biofiim Formation and Controi in Food Processing Facilities, *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety,* 2.
- Choi Y, Lafferty JA, Clemens JR, Todd JK, Gelfand EW, Kappler J, et al (1990).** Selective expansion of T cells expressing Vβ2 in toxic shock syndrome. *J Exp Med.* 1990;172:981–984.
- Christensen BE, Characklis WG (1990).** Physical and chemical properties of biofilms. In *Biofilms.* Edited by WG. Characklis & KC. Marshall. New York, Wiley, pp. 93–130
- Clarke SR, Foster SJ (2006).** Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv. Microb. Physiol.* 51: 187-224
- Clutterbuck AL, Woods EJ, et al (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.,* Mar 31; 121 (1-2): 1-17.
- Coenye T, Nelis HJ (2010).** In vitro and in vivo model systems to study
- Coghlan. 1996.** Slime city. *New Sci.* 2045: 32-36.

- Comte Sophie, Guibaud Gilles, Baudu Michel (2007).** Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials* 140: 129–137.
- Corrigan RM, Miajlovic H, Foster TJ (2009).** Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 9: 22.
- Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ (2007).** The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)* 153: 2435-2446.
- Costerton JW (2004).** A short history of the development of the biofilm concept. *Methods of studying biofilms.* Ghannoum M & O'Toole GA Editors. *Microbial biofilms, ASM Press,* 4-19.
- Costerton JW (1999).** Introduction biofilm *Int J Antimicrob Agents,* 11: 217–21
- Costerton G, Geesey G, GK, Cheng (1978).** How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86-95.
- Costerton JW (1984)** The formation of biocide-resistant biofilms in industrial,
- Costerton Z, Lewandowski DE, Caldwell DR, Korber HM, Lappin-Scott (1995).** *Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, 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, Penades JR (2001).** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 183: 2888-2896.

D

- Darby C, Hsu JW, Ghori N, Falkow S (2002).** *Caenorhabditis elegans*: Plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* 2002; 417: 243–4.
- Davey GA, O'Toole (2000).** *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867
- Davey ME, Caiazza NC, et al (2003).** "Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *J Bacteriol* 185(3): 1027-1036.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science,* 280: 295-298
- Del Pozo JL, and Patel R (2007).** The challenge of treating biofilm-associated
- Devriese LA (1984).** A simplified system for biotyping *staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. Appl. Bacteriol,* 56: 215-220.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz Fj, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al (1997).** Survey of infections due to *staphylococcus species*: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, *Suppl 2:* S114-32.
- Djelloul Daouadji S (2010).** Détection de biofilm à staphylocoques sur cathéters veineux. Mémoire de Magister en biologie moléculaire et cellulaire. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- Donlan RM, Costerton JW (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- Donlan RM (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases;* 8, 9: 881–890.

Donlan RM (2008). Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 133-161.

Duclos P, Caillet J, Javelot P, (1986). "Flore bactérienne aérobie des cavités nasales du lapin d'élevage. "

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

Dupont H (2000). Infections à staphylocoques. Conférences d'actualisation (scientifiques et médicales Elsevier SAS, et SFAR), 447-463.

E

EL Kouri D, Pottier MA, Trewick D, Le Gallou F, Baron D, Potel G (1998). Infections à staphylocoques: aspects cliniques et bactériologiques. *Encycl Méd Chir, (Elsevier, Paris), Maladies Infectieuses, 8-007-A-10,8p.*

Eveillard M (2007). Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, Conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat, Université d'Angers, n°749. p158.

F

Fasquelle R (1974). *Eléments de bactériologie médicale 9ème édition.* Flammarion, Paris. 27-36.

Fasquelle R (1974). *Éléments de bactériologie médicale, 9th edn.* Paris: Flammarion. 27-36

Fauchere J, Avril JL (2002). *Bactériologie générale et médicale.* ellipses, Paris. 213-217

Ferron A (1984). *Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine.* 12ème édition. CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.

Filloux A, Vallet I (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, *Medecine/Sciences, 19 : 77-83.*

Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP (2006). Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Hosp Infect* 62: 120-122. [

Folkesson A, Haagenen JA, Zampaloni C, Sternberg C, Molin S (2008). Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides, *Public Library of Science, Vol. 3 No. 4, pp. 1-1*

Foster T (1996). *Staphylococcus.* In : Baron S, editor. *Medical Microbiology.* 4th ed . Galveston : University of texas Medical Branch at Galveston ;. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>

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

Fowler VG, FeyPD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME, (2001). The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Medical microbiology and immunology* 189: 127-131

Freer JH, Arbuthnott JP (1968). Interaction of staphylococcal alpha-toxin with artificial and natural membranes. *J Bacteriol, 95(3):1153–1168.*

Freny J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont PAD, Nervi C, Fleurette J (1989). *staphylococcus lugdunensis* sp. Nov. And *staphylococcus shleiferi* sp. Nov., two species from human clinical specimens. *J. clin. Microbiol.* 38 : 2110-2111.

G

- Garcia P (2004).** Coagulase_ negative Sthapphylococci, clinical, icrobiological and molecular features to predict true bacteraemia. J Med Microbiol. 53: 67_72. doi 10.1099/jmm, 0 04994.
- Garnier F, Denis F (2007).** Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre. 29: 251, 254.
- Garrity GM, Johnson KL, Bell J, Searles DB (2002).** Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, second ed. Springer-verlag, New York
- Ghellai L, Hassain H, et al (2014).** Detection of biofilm formation of a collection fifty strains of *staphylococcus aureus* isolated in algeria at the university Hospital of Tlemcen.
- Ghuysen JM (1994).** Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Trends Microbiol. 2: 372-380.
- Goller CC, Romeo T (2008).** Environmental influences on biofilm development. Curr. Top.Microbiol. Immunol. 322: 37- 66.
- Golovlev EL (2002).** The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. Mikrobiologiiia 71: 293-300.
- Gotz F (2002).** *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol. 43: 1367-1378.
- Gôtz FT (2006).** Bannerman and K.-H. Schleider. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Prokaryotes 3rd edition (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., stackebrandt, E., Eds): 4 pp 4-75. Springer, New York, NY, USA
- Gross M, Cramton SE, Gotz F, et Peschel A (2001).** Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. Infect Immun. 69, 34233426
- Grov A, Sveen K (1978).** Induction of leukonhemotaxis by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. Acta pathol Microbiol scand (B) ;86B:375-378

H

- Hall-Stoodley L, Stoodley P (2009).** Evolving concepts in biofilm infections.Cell Microbiol 11: 1034-1043
- Hamadi F, Latrache H, El Ghmari A, Ellouali M, Mabrrouki M, Kouider N (2004).** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Annals of Microbiology. 54:213-225
- Hanna Sikorska, Wanda Smoragiewicz (2009).** Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *S.aureus* infections. International Journal of Antimicrobial 27 , P: 202-209
- Hartman BJ, Tomasz A (1984).** Low-affinity penicillin-binding protein associated with betalactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 158: 513-516.
- Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F (1997).** Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol Microbiol. 24: 1013-1024
- Henrici AT (1933).** Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. Journal of bacteriology 25:277-287
- Hermansson M (1999).** The DLVO theory in microbial adhesion. Colloids and Surfaces B-Biointerfases , 14 (14): 105-119
- Hiramatsu K (2001).** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. The Lancet infectious diseases 1: 147-155.

Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen P, Bjarnsholt T (2011). The clinical impact of bacterial biofilms, International Journal of Oral Sciences, Vol. 3 No. 2, pp. 55-65

Hu C, Xiong Nzhang Y ,Rayner S (2012),Chen S . Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun . 419: 617-620. doi : 10.1016/j.bbrc.2012.02.057

Humphrey BA, Dickson M R, Marshall K C (1979). Physiological and in situ observations on adhesion of gliding bacteria to surfaces, Arch. Microbiol., 120: 231

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

I

Irie Y, Parsek M (2008). Quorum sensing and microbial biofilm, Curr Top Microbiol Immunol, 322: 67-84.

Ishida PR, Griffiths (1990). Adsorption of proteins and polysaccharides at aqueousolid interfaces by infrared internal reflection spectrometry. Acs. Symp. Ser. 447, 208224.

Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Applied and environmental microbiology 74: 470-476.

J

Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley ML, Shilliff ME (2008). Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin Microbiol Rev . 21: 26-59.

Jacques M, Aragon V, Tremblay DN (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Animal Health Research Reviews 11,97-121.

Jamal M, Taasneem U, Hussain T, Andaleeb S (2015). Bacterial biofilm: its composition, Formation and role in human infections. Journal of Microbiology and Biotechnology. 4:1-14.

Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, et al (2001). Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. Lancet, 357: 40- 41

Jupin C, anderson S, Damais C, Alouf JE, Parant M (1988). Toxic shock syndrome toxin 1 as an inducer of human tumor necrosis factors and gamma interferon. J Ewp Med ; 167 :752_761

K

Kara Terki (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

Karunakaran E, Mukherjee J, Ramalingam B, Biggs CA (2011). "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. Appl Microbiol Biotechnol 90: 1869-1881

- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K (2000).** A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1549-1555.
- Klein G (2011).** Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Bretagne occidentale, Bretagne
- Klevins RM, Tokars JI, Andrus M (2005).** *Nephrol. News Issues* 19: 37- 38, 43
- Kloos WE, Bannerman TL (1999).** *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Murray PR., Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC. et Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition Washington. 271-276.
- Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D (2002).** Evaluation of
- Krepesky N, Rocha Ferreira RB, Ferreira Nunes AP, Casado Lins UG, Costa E, Silva Filho F, de Mattos-Guaraldi AL, et Netto-dosSantos KR (2003).** Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol.* 46: 280-286
- Kuchma JP, Connolly GA, O'Toole (2005).** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187:1441-1454
- Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR (2009).** Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun* 77: 1623-1635.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991).** Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.*,173,65586567.
- Le Minor L, Veron M (1990).** *Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus»* J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794
- Lewis K (2005).** Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)*, 70: 267-274
- Lewis K (2008).** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 107- 131
- LISTER JL, HORSWILL AR (2014).** *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 4,178
- Little J, Jacobus (1984).** A comparison of two techniques for the isolation of adsorbed dissolved organic material from seawater. *Org. Geochem.* 5: 1-6.
- Ljungh A, et Wadstrom T (1995).** Growth conditions influence expression of cell surface hydrophobicity of staphylococci and other wound infection pathogens. *Microbiol Immunol.* 39, 753-757
- Lock (1993).** Attached microbial communities in rivers. In: *Aquatic Microbiology*, (Ed. T. E. Ford). Blackwell Scientific Publications, Cambridge, 113-138.
- Lowy FD (2003).** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* : 1265-1273.
- Lowy FD (2009)** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 1998;339:520-32.
- Lucet JC, Paoletti X, Demontpion C, et al (2009).** Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in home care settings : Prevalence, duration, and transmission to household members. *Arch Intern Med.* 169 : 1372_8.

M

- M'Hamedi IA (2015).** Evaluation de la formation de biofilms des souches d'*Acinetobacter boumannii* isolées de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat, Université de Tlemcen, 66pages
- Mai GT, McCormack JG, Seow WK, Pier GB, Jackson LA, Thong YH (1993).** Inhibition of adherence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by alginase specific monoclonal antibodies and antibiotics. *Infect Immun* 61: 4338–4343
- Mandell GL (1975).** catalase, superoxide dismutase, and virulence of staphylococcus aureus, in vitro et in vivo studies with emphasis on staphylococcal leukocyte interaction. *J clin Invest*; 55:561
- Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltze MS, Horswill AR, Bayles KW (2009).** Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* 4, e5822.
- Marrack P, Kappler J.** The staphylococcal enterotoxins and their relatives.
- Marti M, Trotonda, MP, Tormo-Mas MA, Vergara-Irigaray, M, Cheung AL, Lasa I, Penades JR (2011).** Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 12: 55-64.
- Martinez LR, Casadevall A, (2007).** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4592- 4601]
- Martinez_pulgarin S, Dominguez Bernal G, Orden JA (2009).** de la Fuente R. Simultaneous lack of catalase and beta toxin in *staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. *Microbial read Engl*.155 :1505_1515. Doi :10.1099/mic.0.25544_0
- Mazmanian SK, Ton-That H, et Schneewind O (2001).** Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 40, 1049-1057.
- Melchiour MB, Vaarkams H, Fink-Gremmels J (2006).** Biofilm : Arol in recurrent mastitis infection, *The veterinary journal*, 171:398-407.
- Mellema FP, Richardus JH, Behrendt M, et al (2010).** Transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to household contacts. *J Clin Microbiol*, 48 : 202_7.
- Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez, JA, Foster, TJ, Penades JR, Lasa I (2009).** Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology.* 191: 832843
- Miqueleto AP, Dolosic CC, Pozzi E, Foresti E, Zaiat M (2010).** Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 101: 1324–1330
- Murray et al 2003; Humphreys 2002.**

N

- Nandy P, Roy S, Thakur AR (2013).** Chaudhuri Sr. Comparative study on characterization of teree sthaphylococcal isolates from varied origin, 1807-36824.
- Nauciel C (2005).** ABREGES connaissances et pratique « Bactériologie médicale ». 2ème édition. MASSON, Paris. 83-85.
- Navarre WW, 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.

- Nelly AN, Maley MP (2000).** Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastisc. *J Clin Microbiol* ; 38 : 724.
- Nielsen P-H, Jahn A, Palmgren R (1997).** Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci Technol* 36: 11–19.
- Nobbs AH, Lamount RJ, Jenkinson H, (2009).** Streptococcus adherence and colonizationl, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 73 No. 3, pp. 407-505
- Nouwen JL, Ott A, Kluytmans-Vandenbergh MFQ (2004).** et al. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a "culture rule". *Clin Infect Dis* ;39(6):806–811. doi:10.1086/423376

O

- O'Gara JP (2007).** ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 270: 179-188
- Oliveira M, Nunes SF, Carneiro C, Bexiga R, Bernardo F, Vilela CL (2007).** Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates, *Veterinary Microbiology*. doi:10.1016/j.vetmic .04.016
- O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, O'Gara JP (2007a).** Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 45, 1379-1388.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1): 49-79.
- Otto M (2008).** Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 207- 228.
- Otto M (2013).** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med*, 64 :175-188

P

- Parot S (2007).** Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat en génie des procédés et de l'environnement. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- Parsek MR, Fuqua C (2004).** Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface- associated microbial life. *J. Bacteriol*, 186: 4427-4440]
- Parsek MR, Singh PK (2003).** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology* 57: 677-701.
- Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD (2001).** What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, *Trends Microbiol* (9):605–610.
- Pecastaings S (2010).** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse pour la préparation de doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique. Université de Toulouse
- Percival SL, Bowler PG (2004 a).** Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 16: 234-240.
- Percival SL, Bowler PG (2004 b).** Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. *World Wide Wounds*.
- Peschel A (2002).** How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology* 2002; 10(4):179–186

- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Gotz F (1999).** Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and
- Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS (2011),** Biofilms made easy, Wound International, 1 (3).
- Phillips PL, RD, Wolcott J, Fletcher GC, Schultz (2010).** « Biofilms made easy », Wounds International, vol. 1, n° 3, 25 mai . [En ligne : www.woundsinternational.com].
- Pidello A (2014).** Principes de chimie redox en écologie microbienne. Editions Quæ, Paris. P : 115.
- Planchon S, Gaillard-Martinie B, Leroy S, Bellon-Fontaine MN, Fadda S, Talon R (2006a).** Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. Food Microbiology. In press
- Poly MC (2007).** Bactériologie médicale technique usuelles. Elsevier Masson.p 170-180.

Q

- Qazl SNA, Counil E (2001).** Morrissey J, Ress CED, Cockayne A, Winzer K, et al. Agr Expression precedes Escape of internalized *staphylococcus aureus* from the host endosome. *infect immun.* 69: 7074_7082
- Quincampoix JC, Mainardi JL (2001).** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation.* 10: 267-275
- Editors R (2013).** Current Protocols in Microbiology . Hoboken, NJ, USA ; John Wiley & Sons, Inc ;. Availale : [http :doi.wiley.com /10.1002 /9780471729259.mc09c02s28](http://doi.wiley.com/10.1002/9780471729259.mc09c02s28)

R

- Reifsteck F, Wee S, Wilkinson BJ, (1987).** Hydrophobicity-hydrophilicity of staphylococci. *J Med Microbiol.* 24: 65-73
- Riber U, Espersen F, Wwilkinson BJ, Kharazmi A (1990).** Neutrophil Chemotactic activity of peptidoglycan .Acomparison between staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS Acta pathol Mirobiol Immunol Scand .* 98: 881-886.
- Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW (2007).** The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8113-8118.
- Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D (2010).** Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol ;* 89: 103–11.
- Romeo T (2008).** Bacterial Biofilms. Springer
- Rosato AE, Kreiwirth BN, Craig WA, et al (2003).** *mec A*-bla *Z* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1460-1463

S

- Samia ghernaout-benchouk (2013).** Prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus* son rôle dans l'infection du site opératoire. These pour l'obtention du doctorat en sciences médicales. TLEMEN.

- Sauer AK, Camper GD, Eherlich JW, Costerton DG, Davies (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154
- Sherertz RJ, Bassetti S, Bassetti-Wyss B (2001).** "Cloud" health-care workers. *Emerging Infect Dis* 2001;7(2):241–244. doi:10.3201/eid0702.700241
- Shunmugaperumal T(2010).** Biofilms eradication and prevention. John Wiley And Son
- Singh P K, Parsek M R, Greenberg E P, Welsh M J (2002).** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.*, 417: 552-555
- Song L, Hobaugh M, Shustak C, Cheley H, Bayley H, Gouaux J.E (1994).** Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *91(26): 12828–12831*
- Sonohara R, Muramatsu N, Ohshima H, et Kondo T (1995).** Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic 1983; 19: 55-106.
- Spiers J, Bohannon SM, Gehrig PB, Rainey (2003).** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* 50: 15-27.
- Stewart PS (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2):107-113
- Suci MW, Mittelman FP, Yu GG, Geesey (1994).** Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2125-2133
- Sugai Chen CH, Wu H (1992).** Bacterial ADP-ribosyl transferase with a substrate specificity of the rho protein disassembles the Golgi apparatus in Vero cells and mimics the action of brefeldin A (19):8903-7.
- Sung JMI, Lloyd DH, Lindsay JA (2008).** *Staphylococcus aureus* host specificity :Comparative genomics of human versus animal isolates by multi_starin microarray. *Microbiology.*;154 :1949_1959 .doi :10,1099 /mic.02007/015289_0
- Sutherland I (2001).** Biofilm exopolysaccharide: a strong and sticky framework.
- Sutherland IW (2001).** The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9 : 222-227.
- Sutra LM, Frederighi JL, Jouve (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire, vol. Polytechnica, Paris. 308 pp.

T

- Thakker M, Park JS, Carey V (1998).** Lee, JC. *Staphylococcus aureus* serotypes 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun.* 1998; 66 (11), p5183-5189.
- Tolker- NIELSEN T, Molin S (2000).** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.*, 40: 75-84
- Tomlin KL, Malott RJ, et al (2005).** Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208- 5218
- Trautner BW, Darouiche R O (2009).** Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, 32 (3): 177–183.
- Tu Quoc PH, Genevaux P, Pajunen M, Savilahti H, Georgopoulos C, Schrenzel J, Kelley WL (2007).** Isolation and characterization of biofilm formation defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 75:1079-1088

U

Utsui Y, Yokota T (1985). Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* (1985) 28: 397- 403.

V

Vallet I, Oison JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A (2001). The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gen clusters (cup) and their involvement in biofilm formation, *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 98 (12): 6911-6916.

Van der Mei HC, et HJ, Busscher (2001). "Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations." *Appl. Environ. Microbiol* 67: 4914-494.

Van der Mei HC, van de Belt-Gritter B, Reid G , Bialkowska-Hobrzanska H, et Busscher HJ (1997). Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties. *Microbiology*. 143 (Pt 12), 3861-3870.

Van Houdt R, Michiels C (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.*, 156: 626-633

Verbrught HA ,Verhoef J, Wilkinson BJ (1983). Peterson Pk. Biology and clinical significance of peptidoglycan antibody response in staphylococcal infections. *Scand j infect Dis suppl.*1983;41;117-125

Vitko NP, Richardson AR (2016). Laboratory Maintenance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MIRSA). In : caico R, Kowalik T , Quarles j, Stevenson B, Taylor 7: e00296-016.

W

Walsh TR, Howe RA (2002). The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol*. 56: 657-675.

Wanner O, Bauchrowitz M (2006). Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News* 60 f: 4-7.

Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch C B , Givskov M, Kjelleberg S (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol*. 185(15): 4585-4592

Weigel LM, Clewell DB, et Gill SR, et al (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 302: 1569-1571

Wertheim HFL, Melles DC (2005). Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* ,12:751–762.

Wertheim HFL, van Kleef M (2006). Vos MC, et al. Nose picking and nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* ;27(8):863–867. doi:10.1086/506401.

Whiteley M, Banger, et al (2001). "Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Nature* 413(6858): 860-864.

Z

Zobell (1943). The effect of solid surface upon bacterial activity. *J. Bacteriol*. 46: 39- 56.

Anonyme: 1 <http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>

Anonyme: 2 <http://www.biofilm.montana.edu>], avec accord du Montana State University

ANNEXES



Annexe 01 : Milieux de culture**1. 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).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

2. Gélose nutritive pour la conservation**Composition :**

Peptone.....	5g
Extrait de viande.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	10.0g

pH=7.3

3. Bouillon nutritive (BN)**Composition :**

Peptone.....	10.0g
Extrait de viande.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g

pH= 7.4

Annexe 02 : Réactifs**Violet de gentiane:**

Phénol.....	2.0 g
Violet de gentiane.....	1.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml

Lugol:

Iodure de potassium.....	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0 g
Eau distillée	300 ml

Alcool (éthanol)**Fuschine de ziehl:**

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0 g
Éthanol à 90°	10 ml
Eau distillée	100 ml

Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)

KH_2PO_4	0, 24 g
Na_2HPO_4	1.4 g
NaCl	8 g
KCl	0.2g
Eau distillée.....	(qsp) 1 L

ANNEXES

Acétate de sodium

Acétate de sodium2g
 Eau distillée.....100 ml

Annexe 3: Valeurs de Densités optiques (630nm) obtenues par la méthode en tubes (TM) pour les souches LMB20330 (A2), LMB20327 (A1), Sa113 et Ica.

	PH5	PH7	PH9	24h	48h	72h
LMB20330						
T (Témoin)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
1	0,021	0,014	0,068	0,001	0,085	0,039
2	0,004	0,014	0,115	0,041	0,024	0,018
3	0,0028	0,067	0,09	0,026	0,051	0,098
Moyenne-T	0,008	0,031	0,090	0,022	0,052	0,051
ECARTYPE	0,010	0,031	0,024	0,020	0,031	0,041
Sa113						
T(Témoin)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
1	0,037	0,07	0,011	0,117	0,075	0,015
2	0,065	0,025	0,037	0,032	0,044	0,051
3	0,06	0,094	0,09	0,11	0,078	0,016
Moyenne	0,053	0,062	0,045	0,085	0,065	0,026
ECARTYPE	0,015	0,035	0,040	0,047	0,019	0,021
Ica						
T(Témoin)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
1	0,02	0,016	0,01	0,015	0,01	0,005
2	0,016	0,010	0,016	0,003	0,016	0,010
3	0,020	0,015	0,020	0,007	0,004	0,013
Moyenne	0,018	0,013	0,014	0,007	0,009	0,008
ECARTYPE	0,002	0,003	0,005	0,006	0,006	0,004

ANNEXES

		PH5	PH7	PH9	24h	48h	72h
A1	T(Témoin)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	1	0,008	0,035	0,036	0,015	0,045	0,007
	2	0,007	0,019	0,028	0,048	0,025	0,002
	3	0,005	0,005	0,021	0,017	0,026	0,002
	Moyenne-T	0,006	0,019	0,027	0,026	0,031	0,003
	ECARTYPE	0,002	0,015	0,008	0,019	0,011	0,003
Sa113	T(Témoin)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	1	0,001	0,012	0,038	0,039	0,161	1,03
	2	0,013	0,047	0,084	0,053	0,22	0,137
	3	0,007	0,016	0,004	0,014	0,146	1,128
	Moyenne	0,006	0,024	0,041	0,034	0,175	0,764
	ECARTYPE	0,006	0,019	0,040	0,020	0,039	0,546
Ica	T(Témoin)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	1	0,003	0,014	0,0025	0,038	0,05	0,003
	2	0,002	0,100	0,008	0,030	0,080	0,005
	3	0,006	0,112	0,025	0,008	0,124	0,002
	Moyenne	0,003	0,074	0,011	0,024	0,084	0,002
	ECARTYPE	0,002	0,053	0,012	0,016	0,037	0,002