

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université « Dr. MOULAY Tahar » de Saida

Faculté des sciences

Département de biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention

Du diplôme de Master en : Biologie

Option: Microbiologie appliqué

Par :

Mlle BRAHIMI SOMIA

Mlle MERABET FATIMA

**Etude de l'effet du glucose et du NaCl sur la formation du
biofilm à *Staphylococcus aureus***

Devant la commission de jury, composée par :

Président	Adli DEH	MCA	Université de Saida
Examineur	Ammam A	MCB	Université de Saida
Promoteur	Ghellai L	MCB	Université de Saida

Année universitaire 2017-2018

Remerciements

« Louange à Allah de nous avoir donné le courage pour réaliser ce travail »

Nous remercions Monsieur Ghellai Lotfi, Maitre de conférences à L'université de Saïda, de nous avoir encadrés, formé, dirigé et surtout de nous avoir fait confiance. Qu'il trouve ici toute notre gratitude.

Nous adressons nos remerciements aussi à :

Monsieur Adli DEH, Maitre de conférences à l'université de Saïda, qui nous a honorés en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Monsieur Ammam A, Maitre de conférences à l'université de Saïda, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos sincères remerciements vont également aux membres du laboratoire de Microbiologie de Saïda-Faculté des sciences.

Nous ne saurions comment remercier nos amies ; Ghania et Bouchra avec lesquels nous avons partagé beaucoup de moments forts tout au long de ce mémoire entre rires et pleures, déprimés et bonheurs.

En fin, nous remercions toute la promotion de Microbiologie appliquée Et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicace

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail :

A mes chers parents

Vous avez su m'apprendre modestement les vraies valeurs de la vie. Votre soutien et vos encouragements ont toujours été sans faille tout au long de ce parcours de longue haleine. La confiance que vous m'accordez me permet d'avancer.

A mes adorables sœurs

Nacira , Fatima ; Habiba ; Saadiya Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour vos soutiens, vos compréhensions et vos encouragements Que ce travail soit le témoin de la reconnaissance infinie. Que Dieu vous protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent.

A MON Chère Frère Mohammed

A mes chères princesses

Soulaf ; Amani ; Ibtihal

A mes chers princes

Islam ; Abdelssamed

A toute La famille : Brahimi

A tout la famille : Toumi

A mon binôme, Merebet Fatima,, qui est pour moi une vraie sœur.

A mes chères proches amis (es)

Qui ont vécu avec moi les meilleurs moments ainsi que les mauvais durant ma vie et surtout Salima ; Naima et Amel

Et à tous ceux qui comptent pour moi.

«Merci».

Somiá

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur, de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mon frère, à mes chères sœurs qui j'aime beaucoup plus Asmaa , Meriem et Fadila et mes chères nièces Soundous et Meriem. A pour leur tendresse, toute l'affection qu'ils m'ont donnée et pour leurs précieux encouragements.

A mon petit prince Mouad et ma princesse Zineb.

A mon binôme, Brahimi Somia, qui est pour moi une vraie sœur.

Un spéciale dédicace pour mes chéries Ahlem et Kheira.

A toute ma famille, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Je vous dis merci.

Fatima.

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Staphylococcus aureus*

1. Description microbiologique	2
2. Taxonomie... ..	3
3. Caractères physiologiques	3
4. Caractères culturels	4
5. Pouvoir pathogène	5
5-1- Les constituants de l'enveloppe... ..	6
5-2- Les composants de surface.....	7
5-3- Les composants sécrétés	9
5-3-1- Les exoenzymes et protéines	10
5-3-2- Les toxines	11
5-4- Les facteurs de persistance.....	14
5-5- Régulation des facteurs de virulence	15
5-6- Facteurs de virulence et spécificité d'hôte.....	15

Chapitre II : Généralités sur les biofilms bactériens

1. Historique.....	17
2. Définition	17
3. Formation du biofilm chez <i>S.aureus</i>	18
3.1. Adhésion réversible... ..	19
3.2. Adhésion irréversible... ..	19
3.3. Formation de micro-colonies.....	19
3.4. Maturation.....	19
3.5. Dispersion	20
4. Structure et composition du biofilm	20
4.1. Différentes formes d'un biofilm	20

4.2. Diversité des biofilms	22
4.3. Composition du biofilm chez <i>S.aureus</i>	24
5. Facteurs influençant la formation d'un biofilm.....	26
5.1. Caractérisation de la surface	27
5.2. Rugosité de la surface	27
5.3. Propriétés physico-chimiques de la surface	27
5.4 Présence de films protéiques sur la surface	27
5.5 Propriété des cellules	28
6. Epidémiologie	29

Partie II : Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude	30
2. Matériels biologiques.....	30
2.1 Souches bactériennes	30
2.2. Revivification des souches	30
2.3. Tests préliminaires d'identification	30
2.3.1. Caractères macroscopiques.....	31
2.3.2. Caractères microscopiques	31
2.3.2.1. Examen à l'état frais	31
2.3.2.2. Examen à l'état coloré (Coloration de Gram)	31
2.3.3. Autres caractères.....	31
2.3.3.1. Recherche de la catalase	31
2.3.3.2. Test coagulase.....	32
2.3.3.3. Test Oxydase	32

2.3.3.4. Test pastorex.....	32
2.4. Conservation des souches	33
3. Techniques d'évaluation de la formation de biofilm in vitro	33
4. Méthode entubes(TM)	33
5. Effet du glucose sur la formation de biofilm chez <i>S.aureus</i>	34
6. Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez <i>S.aureus</i>	34
Partie III : Résultats et Discussion	
1. Résultats de l'identification préliminaire.....	36
1.1. Caractères macroscopiques.....	36
1.2. Caractères microscopiques	37
1.3. Test catalase.....	38
1.4. Test oxydase	38
1.5. Test de coagulase libre	39
1.6. Test Pastorex ou d'agglutination	40
2.Technique d'évaluation de la formation de biofilm in vitro Méthode en tubes(TM)	40
2. 1-Effet du glucose sur la formation des biofilms chez <i>S. aureus</i>	43
2.2- Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez <i>S.aureus</i>	45
Conclusion	48
Références.....	49
Annexe	

Liste des abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique.

ARN : acide ribonucléique

C5a : Complément component 5a

CCL2 : Chemokine ligand 2

CCL3 : Chemokine ligand 3

CCL4 : Chemokine ligand 4

CO₂ : le dioxyde de carbone

DNase : désoxyribonucléase

EPS : substances polymériques extracellulaires

HLA : antigènes des leucocytes humains

IFN γ : interférons gamma

IL-1 β : interleukine 1 bêta

IL6 : interleukine 6

IL-8 : interleukine 8

LTB₄ : leucotriène B₄

NaCl : chlorure de sodium

PH : potentiel hydrogène

PIA : Polysaccharide Interacellular Adhesin

SPA : Staphylococcal protein A

TNF α : facteur de nécrose tumorale alfa

Liste des figures

Figure 01 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)

Figure 02 : Facteurs de virulence de *S. aureus*

Figure 03 : Schématisation de biofilm

Figure 04 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm

Figure 05 : Aspect des colonies des souches A1, A2, Sa113 et Ica sur milieu de Chapman après 24h d'incubation à 37°C

Figure 06 : observation microscopique des souches A1, A2, Sa113 et Ica après coloration de Gram

Figure 07 : test de catalase

Figure 08 : test d'Oxydase

Figure 09 : test de coagulase

Figure 10 : test pastorex 'Staph-Plus latex agglutination

Figure 11 : Effet du Glucose sur la formation de biofilm chez les souches A1, S113, Ica

Figure 12 : Effet du Glucose sur la formation de biofilm chez les souches A2, S113, Ica

Figure 13 : Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez les souches

Figure 14 : Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez les souches

Liste des tableaux

Tableau 1: Valeurs de Densités optiques (630nm) obtenues par la méthode en tubes (TM) pour les souches LMB20330 (A2), LMB20327 (A1), Sa113 et Ica. Effet du glucose sur le biofilm à *S. aureus*.

Tableau 2: Valeurs de Densités optiques (630nm) obtenues par la méthode en tubes (TM) pour les souches LMB20330 (A2), LMB20327 (A1), Sa113 et Ica. Effet du NaCl sur le biofilm à *S. aureus*.

Introduction

Introduction

Staphylococcus aureus est à la fois une bactérie commensale et un pathogène important des mammifères. Il est responsable d'infections très diverses allant de simples infections cutanées à des affections systémiques pouvant engager le pronostic vital de l'individu. *S.aureus* est, de plus, caractérisé par sa capacité et sa rapidité à développer des résistances aux antibiotiques, ce qui rend le traitement de ces infections de plus en plus difficile.

Par ailleurs, ce germe est capable de survivre sous une forme particulière qu'on appelle biofilm. Un biofilm est un ensemble de micro colonies, entourées d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (EPS). C'est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif [(Characklis, 1989) ;(Bourion, 1995) ;(Bosgiraud, 2003) ; (Boutaleb, 2007) ; (Salaun, 2009)]. Sous cette forme, *S. aureus* peut encore devenir moins vulnérable aux conditions physicochimiques et acquiert par conséquent plus de résistance.

Les facteurs intervenant dans la formation de biofilms sont nombreux et variés, parmi les quels on peut citer la surface à coloniser, le milieu environnant, les paramètres physicochimiques et les microorganismes en question.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude qui vise à tester la capacité de deux souches cliniques de *S.aureus* (LMB20327 et LMB20330) à produire le biofilm à différentes concentrations en glucose et NaCl.

synthèse bibliographique

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Staphylococcus aureus*

1. Description microbiologique

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5 μ de diamètre; ce n'est qu'au cours de la lyse ou de la dégénérescence (veilles cellules), que parfois les cellules perdent leur affinité tinctoriale et peuvent devenir à Gram variable (El Kouir, 2003).

Ainsi, ils sont immobiles, non sporulés, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'un pseudo capsule (Couture, 1990).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (Fauchere J.L, 2002). Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) (Couture B, 1990).

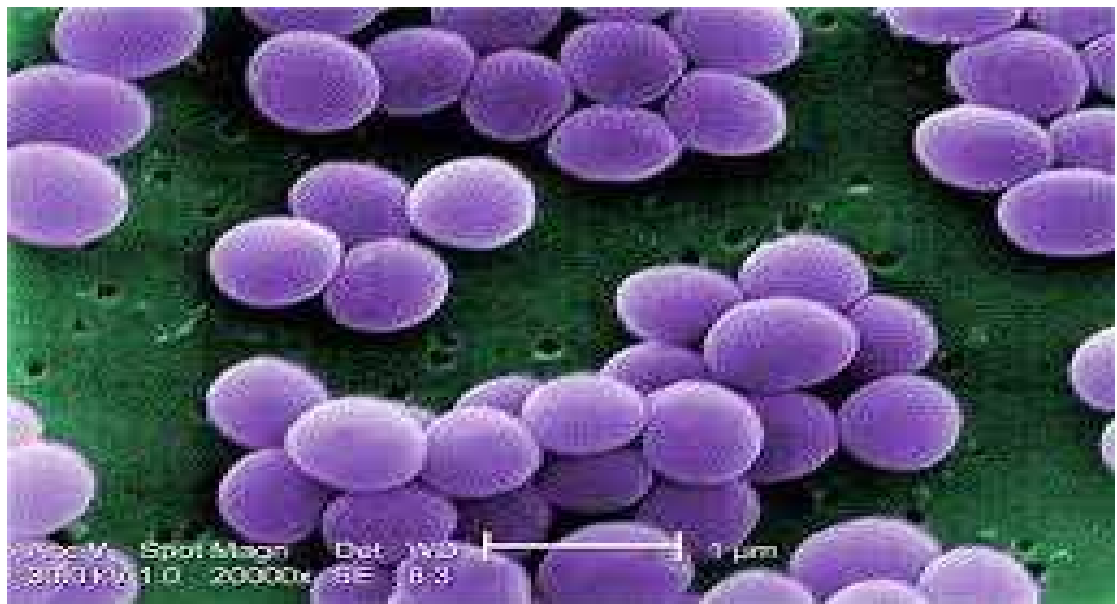


Figure 01.Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)

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

2. Taxonomie

-Les staphylocoques appartiennent à la famille des micrococcaceae composée de quatre genres:

- Le genre *Micrococcus* qui comprend des microcoques qui sont des hôtes normaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Ils sont sans pouvoir pathogène et sont la plupart du temps des contaminants des prélèvements.
- Le genre *Stomatococcus* qui comprend des bactéries faisant partie de la flore buccale.
- Le genre *Planococcus* qui comprend des bactéries du milieu marin.
- Le genre *Staphylococcus* qui regroupe 36 espèces dont les trois principales sont : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus épidermidis* et *Staphylococcus saprophytiques*.

D'autres espèces existent mais avec une fréquence d'isolation moindre, cependant certaines de ces espèces présentent un pouvoir pathogène non négligeable comme par exemple *Staphylococcus hyicus* chez le porc (**Décocter**).

3. Caractères physiologiques

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (**Kloos et al., 1990**). De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque (**Couture, 1990**). *S. aureus* possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (**Ferron, 1984**). Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* (**Fauchere, 2002**).

Cependant, la production de pigments (caractères culturels), d'hémolyse et la dégradation du mannitol n'ont pas toujours lieu; ce sont des indices auxquels on ne peut se fier pour identifier le germe de façon certaine. Il faut donc procéder à son

Identification par l'étude de différentes propriétés biologiques et biochimiques (**Fauchere, 2002**). Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase (**Fauchere, 2002**). Cependant, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (**Couture, 1990**).

4. Caractères culturels

Peu exigeants sur le plan nutritif, les staphylocoques sont aérobies anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO₂ pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et un de quatorze acides aminés dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique. La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7.5, mais de grandes variations sont tolérées (**Couture, 1990**). En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (**Kloos et al., 1975**). Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl jusqu'à 7,5% (qui inhibe pour cette raison, la plupart des autres germes), ce milieu sélectif rendu différentiel par l'addition de Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol, permet à la fois d'isoler le staphylocoque à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers un *S. aureus* ou un *S. epidermidis* (**Kloos et al., 1990**).

5. Pouvoir pathogène

La pathogénie de *S. aureus* est un phénomène complexe, faisant intervenir une multitude de facteurs de virulence. C'est l'action combinée de l'ensemble de ces facteurs qui explique le fort pouvoir pathogène de cette bactérie et la multitude de maladies humaines qu'elle provoque (Hiron, 2007).

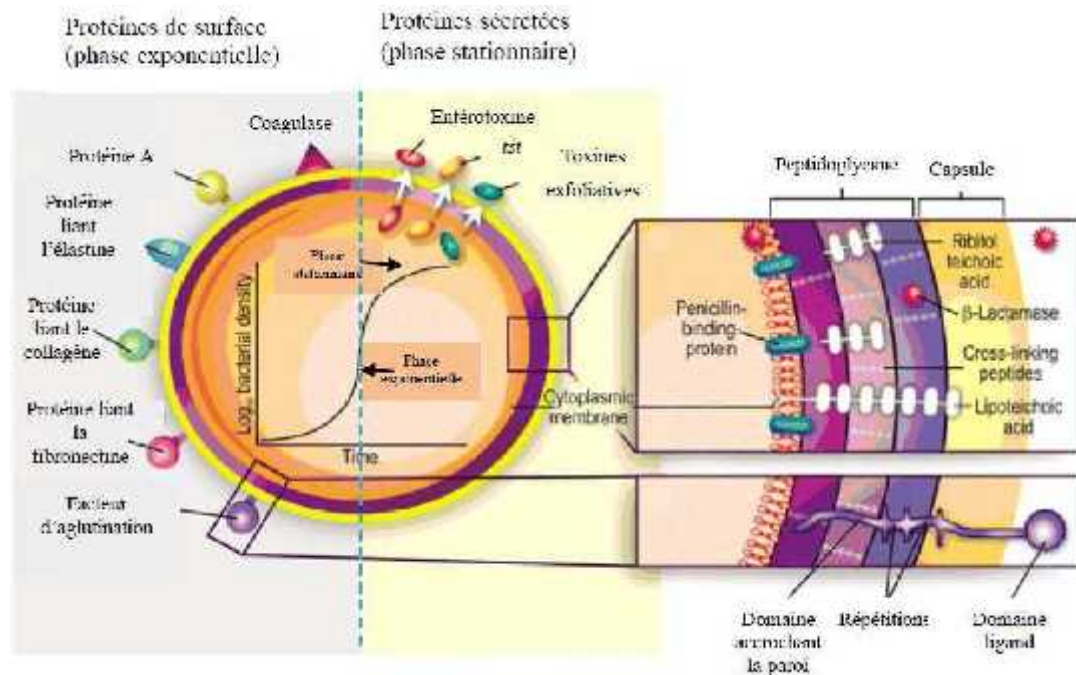


Figure 2. Facteurs de virulence de *S. aureus* (Gordon et al, 2008)

S. aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et communautaires [(Vincenot et al., 2008); (Kurlenda et Grinholc, 2012); (Otto, 2012)]. Les infections suppuratives superficielles cutanéomuqueuses tels les furoncles, les folliculites, les impétigos, les sinusites et les otites sont les plus couramment rencontrées.

Ces infections peuvent se compliquer par une diffusion hématogène de la bactérie ou par une extension locorégionale de l'infection. *S. aureus* est aussi responsable de méningites, des infections respiratoires et urinaires. Des infections non suppuratives d'origine toxique appelées toxémies staphylococciques sont, elles, dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes

cutanés staphylococciques par les exfoliatines, le choc toxique staphylococcique et les intoxications alimentaires par les entérotoxines [(Foster, 1996);(Harris et al., 2002)]. En plus des infections aiguës, *S. aureus* peut provoquer des infections chroniques.

La plupart d'entre elles sont dues à la capacité de ce pathogène à adhérer sur les implants médicaux temporaires (ex : cathéters) ou permanents (ex: prothèses orthopédiques, valves cardiaques) et à former un biofilm [(Harris et Richards, 2006) ;(Bernard, 2006)].

5.1. Les constituants de l'enveloppe

Ils interviennent dans la reconnaissance de *S. aureus* par les cellules hôtes. Leur nature va moduler les interactions et les mécanismes de reconnaissance par les systèmes immunitaires.

- **La capsule polysaccharidique**

La capsule améliore la virulence en conférant à la bactérie une meilleure résistance face au système immunitaire de l'hôte, notamment en interférant avec la phagocytose [(Nilsson I-M, 1997) ;(O'Riordan K, 2004) ;(Cunnion KM, 2003) ; (Nanra JS, 2013)]et en empêchant les anticorps d'accéder aux épitopes de surface. Elle facilite aussi l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes. Dans ce cas, elle induit la sécrétion par ces cellules de cytokines inflammatoires telles qu'IL-1 β , IL6, TNF α et IFN γ et la chimiokine IL-8 [(Nilsson I-M, 1997) ;(Soell M,1995)].

- **Le peptidoglycane**

Le peptidoglycane est immunogène et mitogène [(Groß A ,1978) ;(Verbrugh HA ,1983)]. Il a une activité chimiotactique sur les neutrophiles en stimulant l'activation de la cascade du complément (Riber U, 1990). Il stimule la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 IL8, CCL2, CCL3, CCL4) par les mono Le WTA de *S. aureus* est impliqué dans la forme cellulaire, la division cellulaire, l'adhésion cellulaire, la formation de biofilm et la pathogénicité [(Xia G, 2010) ;(Gross, 2001) ;(Swoboda JG, 2009)]. De plus, il confère

une résistance aux β -lactames dans les souches résistantes à la méticilline (Brown S. cytes et les macrophages [(**Takenchi O,1999**) ;(**Leemans JC, 2003**)]. Bien que le peptidoglycane seul entraîne une faible induction de l'expression de cytokines, il a un effet synergique avec les acides téichoïques[(**Volz T,2010**) ; (**Fournier B,2005**)].

) Les acides téichoïques (TA)

Par ailleurs, sa structure semble gouverner le THG puisque *S. Aureus* échange plus efficacement de l'ADN avec une bactérie possédant un WTA de structure similaire et ce, même si elle appartient à un autre genre (**Winstel V, 2013**). Au vu de son importance dans la biologie de *S. aureus*, le WTA est aujourd'hui considéré comme une cible potentielle pour de nouveaux antibiotiques (**Sewell EW,2013**). Le LTA de *S. aureus* provoque une réponse inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines et chimiokines (TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-8, LTB4, C5a, MCP-1, MIP1 α et GCSF) par les phagocytes mononucléés. Le profil cytokinique induit par le LTA est similaire à celui produit par la bactérie entière (**Von Anlock S, 2003**). Le LTA participent ainsi à la formation de pus en recrutant les neutrophiles via les chimiokines (**Fournier B, 2005**).

5.2. Les composants de surface

✓ La protéine A

La protéine A est produite lors de la phase exponentielle de croissance. Elle est retrouvée dans la majorité des souches pathogènes pour l'homme (**Koreen L, 2004**). Elle se fixe sur le fragment Fc des immunoglobulines de classe G et M ce qui perturbe l'opsonisation et donc la phagocytose de la bactérie (**Falugi F, 2013**). Elle a un rôle dans le phénomène d'agrégation bactérienne et 26 favorise le développement de biofilms, renforçant ainsi l'adhésion et la protection de la bactérie face à l'action des agents antimicrobiens produits par les cellules immunitaires (**Merino N, 2009**).

✓ Les adhésines

S. aureus peut exprimer à sa surface un panel de protéines favorisant l'attachement à certaines molécules de l'hôte telles que la fibronectine, la laminine et le collagène qui forment la matrice extracellulaire des surfaces épithéliales et endothéliales. Ces protéines bactériennes sont nommées « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules » ou MSCRAMM [(Clarke SR, 2006) ;(Foster TJ, 2013)]. Les protéines de liaison à la fibronectine et au fibrinogène sont retrouvées dans la majorité des souches de *S. aureus*. Elles contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang tels que les cathéters (Vandaux PE, 1995). La protéine de liaison au fibrinogène, également appelée coagulase liée ou clumping factor, est responsable de l'adhésion bactérienne aux caillots sanguins et aux tissus endommagés [(Foster TJ, 2013) ; (Bodén MK, 1989)]. C'est une protéine de surface pouvant aussi être diffusible suite à l'autolyse. Contrairement à ce que son nom semble indiquer, elle est dépourvue d'activité enzymatique. Sa structure, complémentaire de celle du fibrinogène, lui permet d'interagir directement avec lui ou avec des monomères de fibrine. Ainsi, elle inhibe la phagocytose par les neutrophiles en formant à la surface de *S. aureus* une couche protectrice de fibrinogène, empêchant la reconnaissance du pathogène, même opsonisé (Ko Y-P, 2013). Au sein du genre *Staphylococcus*, seule l'espèce *S. aureus* possède cette protéine. Cette observation associée aux propriétés intrinsèques de la coagulase liée ont permis la mise au point d'un test de différenciation des espèces de staphylocoques basé sur l'agglutination d'hématies en présence de *S. aureus* (Brown DFJ, 2005). La protéine de liaison au collagène est plutôt retrouvée dans les souches causant de l'arthrite septique et de l'ostéomyélite (Patti JM, 1994). L'interaction avec le collagène favorise l'attachement de la bactérie aux tissus endommagés où la couche sous-jacente a été exposée.

5.3. Les composants sécrétés

5.3.1. Les exoenzymes et protéines

La coagulase libre

La coagulase libre, ou staphylocoagulase, est une protéine diffusible thermostable exprimée pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne. En se liant à une coaguline proche de la prothrombine dans le plasma, elle forme un complexe nommé staphylothrombine qui convertit le fibrinogène en fibrine (**Cheng AG, 2010**). Cette réaction entraîne la coagulation locale du plasma autour des cocci les protégeant de la phagocytose. Elle est à l'origine de la thrombophlébite suppurée (**Brenes JA, 2012**).

La fibrinolysine

La fibrinolysine, ou staphylokinase, est une protéine thermolabile et antigénique. Elle est capable de métaboliser le plasminogène en plasmine et ainsi induire la fibrinolyse (**Molkainen T, 2002**). En conditions physiologiques, ce mécanisme est associé à celui de la coagulation pour éviter l'apparition de thromboses. Dans le cas d'une infection à *S. aureus*, la fibrinolysine perturbe cet équilibre en favorisant la fibrinolyse et entraîne des saignements. Parallèlement, la fibrinolysine possède la capacité de se lier aux défensines et de former un complexe avec celles-ci inhibant leur activité bactéricide (**Jin T, 2004**).

Les lipases

Les lipases sont un ensemble de protéines regroupant les lipases elles-mêmes, les phosphatases et les estérases. Elles sont responsables de la dégradation des lipides de l'hôte (**Simons J-WF, 1996**). En effet, les molécules lipidiques de l'hôte telles que les acides gras présentent un effet tensio-actif qui perturbe l'intégrité de la membrane bactérienne. 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 C, 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.

□ **Hyaluronidase**

La hyaluronidase est une enzyme extracellulaire thermolabile qui digère l'acide hyaluronique. Cette dépolymérisation de l'acide hyaluronique, substance fondamentale de la matrice du tissu conjonctif de l'hôte, contribue au processus infectieux en favorisant les 28 disséminations via la dégradation des tissus (Farrell A, **1995**). Au sein du genre *Staphylococcus*, seule *S. aureus* possède cette enzyme (**Hart ME, 2009**).

▪ **Désoxyribonucléase thermostable**

Staphylococcus aureus est la seule espèce du genre *Staphylococcus* à produire une nucléase thermostable. Elle permet ainsi une identification rapide de *S. aureus* dans des cultures de sang (**Madison BM, 1983**). Elle a une activité exo- et endo-nucléasique qui lui permet de dégrader l'ADN mais aussi l'ARN des cellules de l'hôte (**Hu Y, 2013**). Elle est active à pH alcalin en présence de calcium (**Hu Y, 2013**).

▪ **Les Protéases**

Les protéases retrouvées chez *S. aureus* regroupent les métalloprotéases, les thiol protéases et les sérines protéases. Parmi ces dernières, les mieux décrites sont les protéases glutamate dépendantes dont la protéase V8, ou glutamyl-endoréptidase qui clive les polypeptides préférentiellement après un glutamate mais aussi, plus rarement, après un aspartate. Initialement identifiée chez la souche *S. aureus* V8, il est maintenant établi qu'elle est exprimée par 67% des souches virulentes [(**Arvidson S, 1973**) ;(**Drapeau GR, 1978**)]. Lors de l'infection, elle peut cliver certaines protéines de l'hôte comme les chaînes lourdes des Immunoglobulines, indépendamment de leur

classe (**Prokeova L,1992**) ou l'inhibiteur de protéase $\alpha 1$, induisant une augmentation de l'activité protéolytique de l'hôte (**Potempa J,1992**). Elle assure également la protection de *S. aureus* en clivant certains peptides antimicrobiens cationiques tels que la cathélicidine LL-17 produite par les kératinocytes et les neutrophiles (**Sieprawaska-Lupa M,2004**). Parallèlement, la protéase V8 agit également sur les protéines bactériennes elles-mêmes, notamment par clivage de la coagulase liée, entraînant une diminution de l'adhérence aux cellules hôtes et donc une meilleure dissémination (**McGavin MJ,1997**). En terme de pathogénicité, il a été montré qu'un mutant *S. aureus* n'exprimant plus la protéase V8 présentait une virulence atténuée dans trois modèles murins d'infection différents[(**Conlter SN,1998**) ; (**Shaw L,2004**)].

▪ 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 (**Mandell GL,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-Pulgarin S,2009**).

5.3.2.Les toxines

➤ L' α -hémolysine

L' α -hémolysine (hla) est une toxine cytolytique produite par plus de 90% des souches de *S. aureus* [(**Peacock SJ,2002**) ; (**Tavares A,2014**)]. C'est un des facteurs de virulence majeur de cette bactérie et un des mieux caractérisés. C'est une protéine thermostable et antigénique, exprimée lors de la phase exponentielle de croissance. Cette α -toxine a la capacité de former des pores dans les membranes cellulaires de

l'hôte. Pour ce faire, elle se lie tout d'abord à son récepteur à la surface de la cellule cible, la molécule ADAM10 (**Wilke GA,2010**). Puis, elle s'insère dans la membrane plasmique où elle s'oligomérisse sous forme d'heptamères cylindriques [(**Song L,1996**) ;(**Gonaaux E,1998**)]. Les canaux amphipatiques ainsi formés induisent une entrée de diverses molécules de faible poids moléculaire et notamment d'ions calcium, second messenger important impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires chez les mammifères. Majoritairement, ce phénomène conduit à la lyse cellulaire (**Bhakdi S ,1999**). En contexte d'intoxication sub-lytique, des études ont mis en évidence une réponse de la cellule cible consistant notamment en l'altération des voies de signalisation cellulaires responsables de la prolifération cellulaire, de la réponse inflammatoire, de la sécrétion de cytokines et des interactions cellulaires (**Schmi HMJ, 2005**). Lors de l'infection, l'effet cytolytique est un facteur primordial dans la progression de la maladie puisqu'il induit une altération des tissus en exerçant une action dermonécrotique mais aussi neurotoxique[(**Wiseman GM,1975**) ;(**Kebaier C,2012**)].

➤ **β-hémolysine**

Cette β-toxine est une phospholipase de type C, ou sphingomyelinase, qui altère les membranes riches en lipides. Son activité hémolytique sur les érythrocytes dépend de leur 30 contenu en sphingomyéline (**Wiseman GM,1975**). Elle a aussi un rôle dans la colonisation de la peau par sa capacité à endommager les kératinocytes (**Katayama Y,2013**). La majorité des isolats humains n'expriment pas la β- hémolysine, mais elle a un haut niveau d'expression dans les souches animales (**Dinges MM,2000**).

➤ **δ-hémolysine**

La δ-hémolysine est une protéine thermostable, hydrophobe et faiblement antigénique, produite par 97% des souches [(**Dinges MM,2000**) ; (**Vincenot F,2008**)]. Elle a un effet cytotoxique en agissant comme un détergent sur les membranes biologiques. Elle exerce un effet pro-inflammatoire en raison de sa spécificité de liaison pour les neutrophiles et les monocytes (**schmitzF-J,1997**).

➤ **Toxines à 2 composants**

Les toxines à 2 composants sont constituées d'une protéine S et d'une protéine F. L'association et l'oligomérisation de ces protéines permettent la formation de pores dans la membrane de la cellule hôte (**Vandensch F,2012**). Parmi les toxines à 2 composants, on retrouve la γ -hémolysine, la Leucocidine de Pantone-Valentine (PVL), lukED et lukGH (oulukAB).

La γ -hémolysine, ou leucotoxine, est exprimée par 50 à 90% des souches, alors que la PVL est produite par 2 à 20% des souches [(**Peacock SJ, 2002**) ; (**Mesrati I, 2010**)]. La γ -hémolysine agit de concert avec la PVL pour perturber la perméabilité de la membrane des neutrophiles (**Staali L, 1998**). Elle a aussi une action sur les lymphocytes T, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, et est capable de lyser une variété d'érythrocytes de mammifères [(**Dinges MM, 2000**) ; (**Vincenot F2008**)]. Le rôle de la PVL n'est pas encore clairement défini, mais elle semble être un facteur important de la nécrose tissulaire, notamment des dommages musculaires, car elle est retrouvée dans la majorité des infections nécrosantes (**Tseng CW,2009**). La PVL semble également avoir un impact majeur dans l'amplification des réponses immunes de l'hôte [(**Yoong P,2013**) ; (**Perret M,2012**)]. Les toxines lukED et lukGH, peu étudiées jusqu'ici, commencent à être mieux caractérisées. La toxine lukED est présente chez 60 à 80% des isolats cliniques (**Von-eiff C,2004**). Elle est capable de lyser les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles [(**Vandensch F,2012**) ; (**Yoong P,2013**) ; (**Reyes-Robles T,2013**) ; (**Alonzo III F, 2012**)]. La toxine LukGH peut lyser efficacement les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles [(**Yoong P,2013**) ; (**Du Mont Al,2011**) ; (**Malachowa N,2012**)].

➤ **Entérotoxines**

Les entérotoxines sont responsables d'intoxinations alimentaires dues à la consommation d'aliments contaminés par *S. aureus*. Ce sont des protéines thermostables sécrétées par *S. aureus* dans l'aliment et résistantes aux enzymes protéolytiques. Il existe plusieurs variants antigéniques d'entérotoxines, néanmoins,

ce sont toutes de puissants superantigènes capables de stimuler la prolifération non spécifique des lymphocytes T (**Belaban N ,2000**).

- Toxine du syndrome de choc toxique 1 (TSST-1):

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

➤ Exfoliatine

L'exfoliatine, ou épidermolysine, est responsable de différentes formes de staphylococcies cutanées bulleuses. C'est une toxine protéique épidermolytique ayant une spécificité d'action sur la peau, dont l'activité entraîne un décollement intra-épidermique (**Elias PM ,1977**).

5.4. Les facteurs de persistance

S. aureus peut former des biofilms. Ce mode de croissance entraîne la diversification de la population bactérienne en favorisant l'apparition de variants

. Ces variants sont un état de dormance de la bactérie et jouent un rôle majeur dans la stabilité et la persistance des biofilms (**Mirani ZA,2014**). Ces variants ,ou small colony variants (SCVs) sont originaires de mutation dans les gènes métaboliques, tels que *sigB* et *agr*, et présentent ainsi une diminution de la pigmentation, une perte de l'activité hémolytique et de dissémination (**savage VJ,2013**). Ils peuvent faire partie du cycle normal de croissance de la bactérie ou être induit par des conditions de stress, telles que les antibiotiques, l'inanition et les peptides cationiques de l'hôte [(**Mirani ZA, 2014**) ; (**Proctor RA, 2014**)]. Ces SCVs formés par *S. aureus* ont été liés aux infections chroniques, récurrentes et résistantes aux antibiotiques (**Proctor RA ,2014**). Ces SCV jouent donc un rôle majeur dans la persistance de la bactérie, en particulier dans les ostéomyélites, les infections associées aux corps étrangers (**Sendi P,2006**) et les infections respiratoires dans les patients en fibrose kystique (**Kahl B,1998**). Ils ont la capacité de survivre à l'intérieur des cellules hôtes, et notamment dans les cellules épithéliales et endothéliales (**schroder A, 2006**). En effet, ils peuvent résister à l'activité bactéricide des

lysosomes. De plus, ils sont moins sensibles à l'activité bactéricide des peptides antimicrobiens **(Glaser R, 2014)**. Ainsi, les SCV de *S. aureus* permettent d'échapper aux défenses de l'immunité innée et de favoriser l'établissement et la persistance de l'infection. En conclusion, la figure 6 présente un récapitulatif des divers facteurs de virulence de *S. aureus* et le rôle qu'ils jouent dans sa pathogénicité. On pourrait rajouter le THG en tant que facteur indirect étant donné son rôle primordial dans l'émergence de nouvelles résistances. La pathogénicité de *S. aureus* est ainsi étroitement liée à l'expression de ces différents facteurs **(Ferry T, 2005)**.

5.5. Régulation des facteurs de virulence

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, les protéines de surface sont principalement synthétisées lors de la phase exponentielle de croissance. Elles permettent la fixation de la bactérie à la matrice extracellulaire et la colonisation des tissus. Par la suite, la dissémination à travers les tissus adjacents est rendue possible par l'expression des protéines sécrétées, telles que les protéases, synthétisées principalement lors de la phase stationnaire de croissance. Cette cinétique précise d'expression des facteurs de virulence de *S. aureus* nécessite donc d'être étroitement régulée au cours des différents stades de l'infection. Les locus *agr* (accessory gene regulator) et *sar* (staphylococcal accessory regulator) sont notamment impliqués dans cette régulation séquentielle complexe. Le locus *agr* code pour un système de transduction du signal à deux composants **(Gordonc P, 2013)**. Dès le début de la phase de décélération, le locus *agr* régule négativement la production des protéines de surface et régule positivement l'expression des toxines sécrétées et des enzymes extracellulaires **[(Qazi SAN, 2001) ; (Tegmark R, 1998)]**. L'activation ou la répression de *sarA* influe sur l'activation du système *agr* **[(Gordonc P, 2013) ; (Tegmark R, 1998)]**. De plus, l'expression d'*agr* et *sar* est elle-même régulée par le facteur sigma alternatif σ_B en réponse à l'activation du gène *rsbU* **[(Qazi SNA, 2001) ; (Aerbert 2010) ; (Jonsson I- M, 2004) ; (Giachino P, 2001)]**.

5.6. 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* (**Sung JM-L ,2008**). 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 (*fnbA*, *fnbB* et *coa*) 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'opportunisme 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*.

Chapitre II : Généralités sur les biofilms bactériens

1. Historique

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) ; qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de microorganismes au niveau de ses dents (**Donlan, 2002**). En 1932 ; Henerici observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames lors l'expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il a été prouvé que 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).]

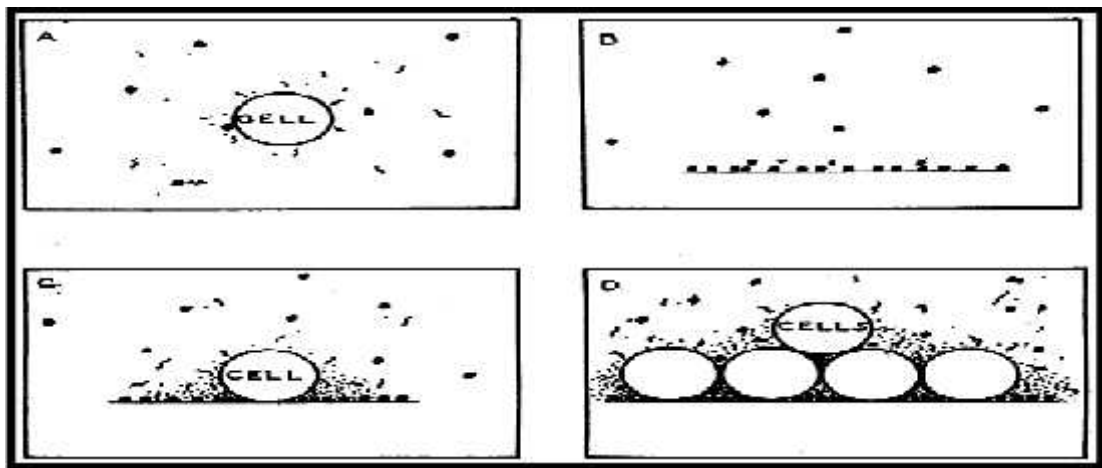


Figure 3 : Schématisation de biofilm par Zobell, 1943

2. Définition

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice qu'ils secrètent (Jain et al., 2011). C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement

(Espinasse et al., 2010 ; Van houdt et Michiels,2005).Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes (Behlau et Gilmore,2008).

3. La formation de biofilm par *S.aureus*

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (Annous et al., 2009), telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (Vu et al., 2009). Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm.

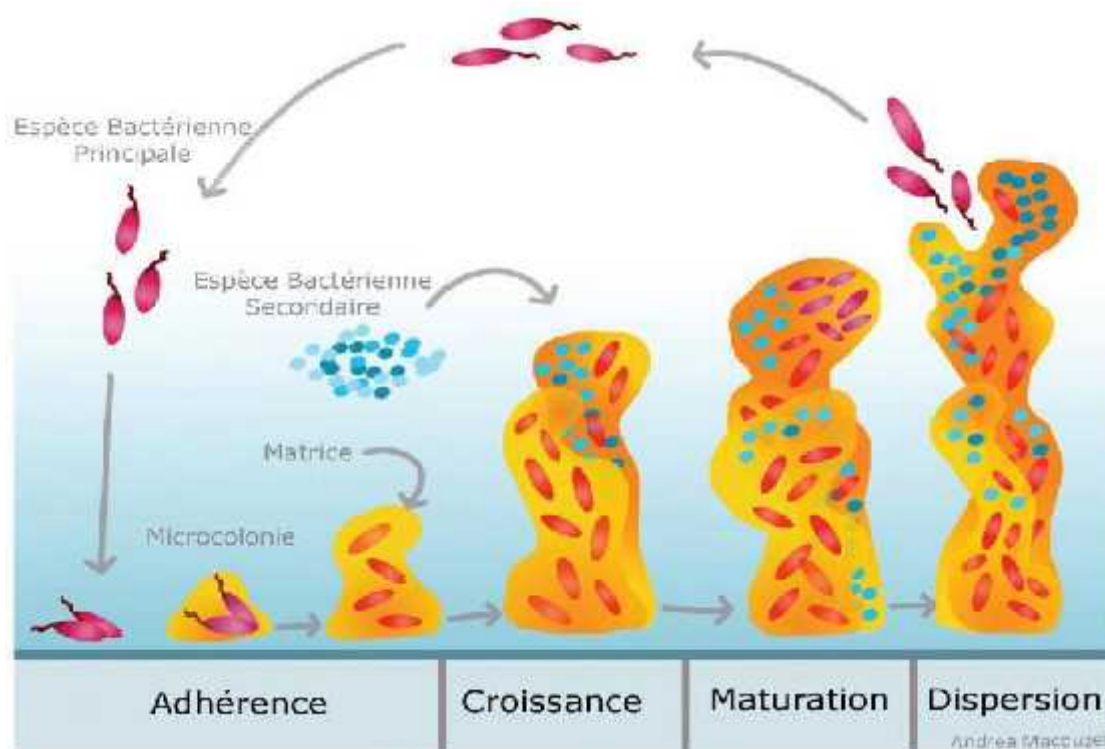


Figure 4 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm (Yannick et al., 2014).

3.1. L'adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (**Høiby et al., 2011**) par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide (**Beloin et al., 2008**). L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin et al., 2008**).

3.2. L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible 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, par exemple les fimbriae et les curli pour *E.coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (**Beloin et al., 2008**).

3.3 Formation de micro-colonies

Une fois l'attachement des bactéries est irréversible, les bactéries commencent à se diviser et à former des microcolonies (**Chmielewski et Frank, 2003**) qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface (**Stanley et al., 2003**). Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel [(**Costerton et al., 1995**) ; (**Davey et O'Toole, 2000**) ; (**Sauer et al., 2002**)].

3.4. Maturation

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (**Folkesson et al., 2008**), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke et al., 2006**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque

la dégradation des résidus présentent dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (**Jacolosen et al., 2008**).

3.5. Dispersion

Le détachement des bactéries se fait selon trois étapes :

- Détachement des cellules de la colonie du biofilm;
- Translocation des cellules vers un nouvel emplacement;
- Fixation des cellules à un substrat dans le nouvel emplacement (**Kaplan, 2010**)

Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement. 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 (**Donlan, 2002**).

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 microorganismes, 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., 1984**).

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., 1984**). 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 lié 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 produisent une substance polymérique extracellulaire (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 (Jamal *et al.*, 2015), et des déchets du métabolisme cellulaire ,débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaire) [(Branger *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 favorisant la formation d'un biofilm

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

5.1. Caractéristiques de la surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm **(De Chalv et De Rochemonteix, 2009)**.

5.2. Rugosité de la surface

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies 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 Costerton, 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 et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux **(Bendinger, 2003)**.

5.4. 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**).

5.5. 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. Epidémiologie

Parallèlement à la colonisation des muqueuses, l'implantation de bactéries sur des surfaces inertes représente également une source de contamination majeure pour les patients en milieu hospitalier. Les bactéries, dites sessiles, peuvent alors former des tapis microbiens désignés sous le terme de biofilms (**Costerton et al., 1978**). La compréhension des mécanismes de formation des biofilms présente donc un intérêt inéluctable, dans la mesure où elle permettrait de développer des stratégies curatives ou préventives afin de prévenir la multiplication et la persistance de ces pathogènes potentiels (**Balestrino, 2006**).

Partie II. Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude

Notre étude a été réalisée au laboratoire de Microbiologie et de chimie de l'Université Dr Moulay Tahar Saïda.

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**), et 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 étaient ensemencées par stries transversales sur milieu de Chapman. Les boîtes 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

L'importance de cette enzyme a été évoquée, elle empêche en effet l'accumulation d'H₂O₂. La technique la plus simple consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée et y à ajouter un peu de la culture à étudier. Si la souche

examinée possède une catalase positive, nous observons un dégagement immédiat des bulles gazeuses (**Marchal, 1987**).

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

Les cytochromes sont des protéines intervenant dans les mécanismes d'oxydoréduction. Les cytochromes de type 'c' sont détectés par le test de l'oxydase. L'absence de l'oxydase chez le genre *Staphylococcus* permet de le différencier des genres *Kocuria*, *Micrococcus*, *Macrococcus* et *Arthrobacter* [(**Kloos et Schleifer, 1986**) ;(**Brun et Bes, 2000**)].

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 60secondes.

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 :

Toutes les souches de *S. aureus* identifiées ont été conservées en double réplique, sur gélose nutritive inclinée à +4°C et dans du bouillon nutritif à 15% (v/v) glycérol à – 20°C. Ce dernier étant recommandé pour une bonne conservation à long terme des souches bactériennes.

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 tubes(TM)

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 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 glucose sur la formation de biofilm chez *S.aureus*

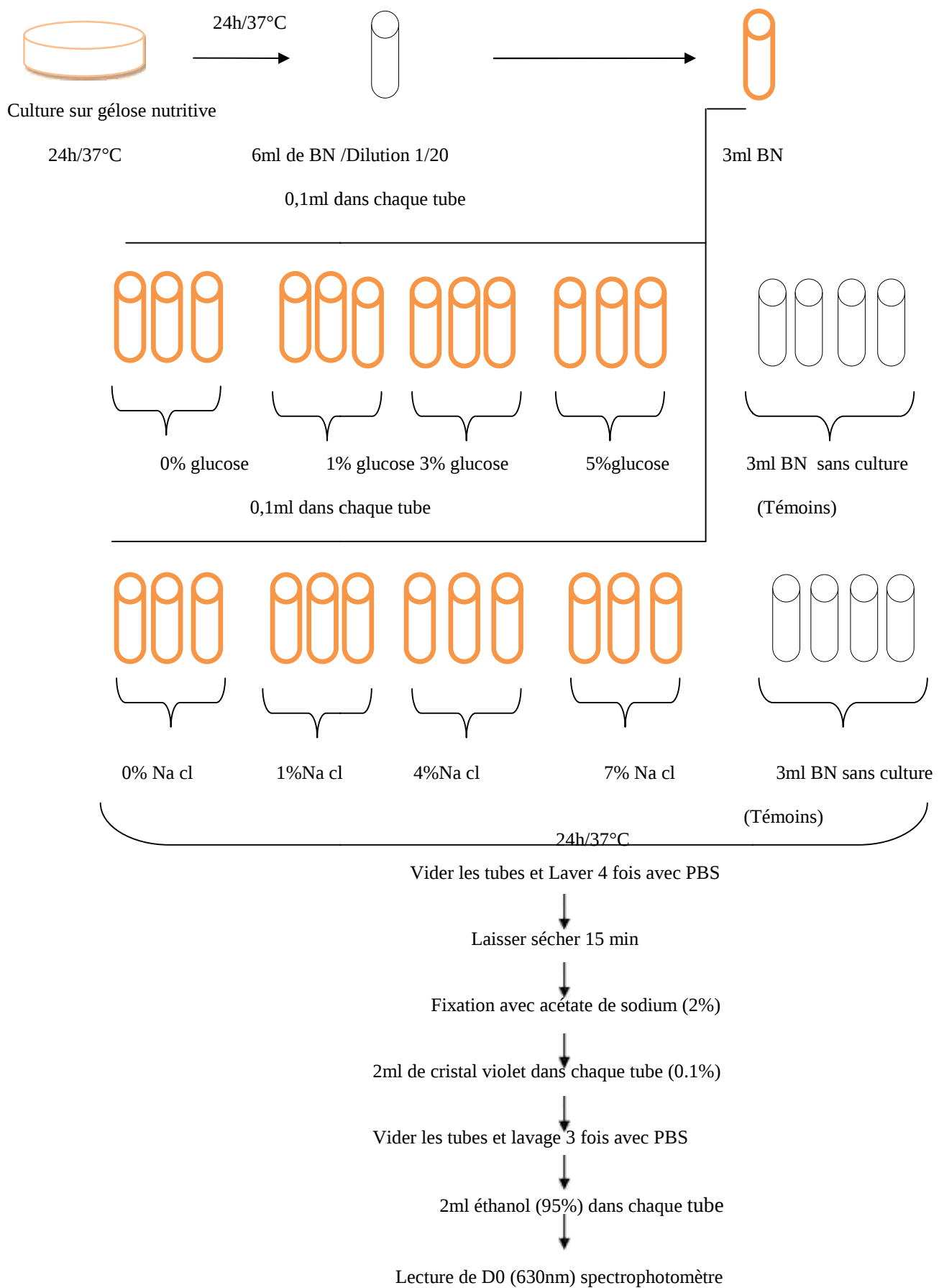
A partir d'une culture jeune de 24h, une colonie estensemencée dans 6ml de bouillon nutritif. Après incubation à 37°C pendant 24h versé 0.1ml de cette suspension dans des tubes en verre contenant 3ml de bouillon nutritif à différentes concentration en glucose (**0%, 1%, 3% et 5%**). On a utilisé trois tubes pour chaque concentration.

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

6. Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez *S.aureus*

A partir d'une culture jeune de 24h, une colonie estensemencée dans 6ml de 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 en NaCl (**0%, 1%, 4% et 7%**). On a utilisé trois tubes pour chaque concentration.

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 II. 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 été ensemencées dans le milieu de Chapman puis incubés 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 05). 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.

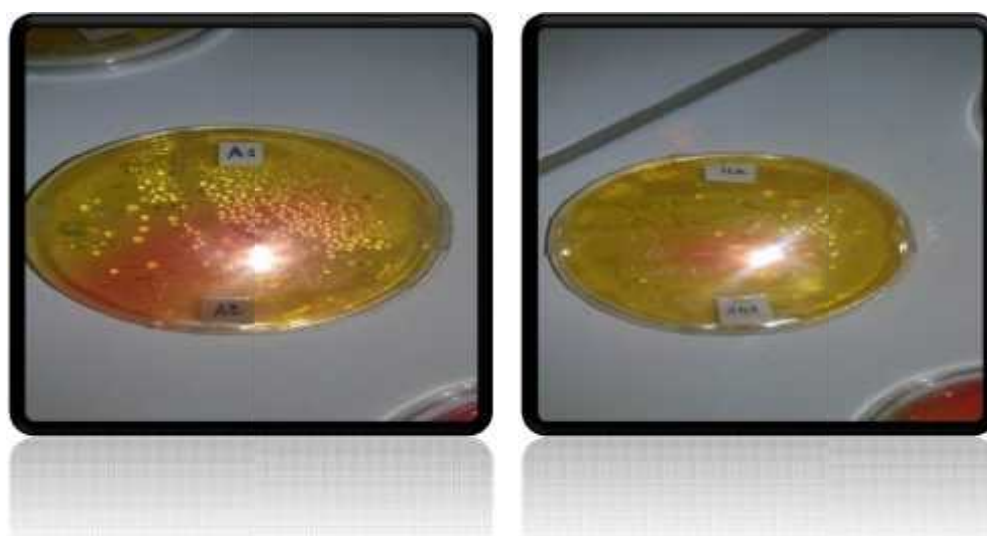


Figure 05. Aspect des colonies des souches A1, A2, Sa113 et Ica sur milieu de Chapman après 24h d'incubation à 37°C

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 06).

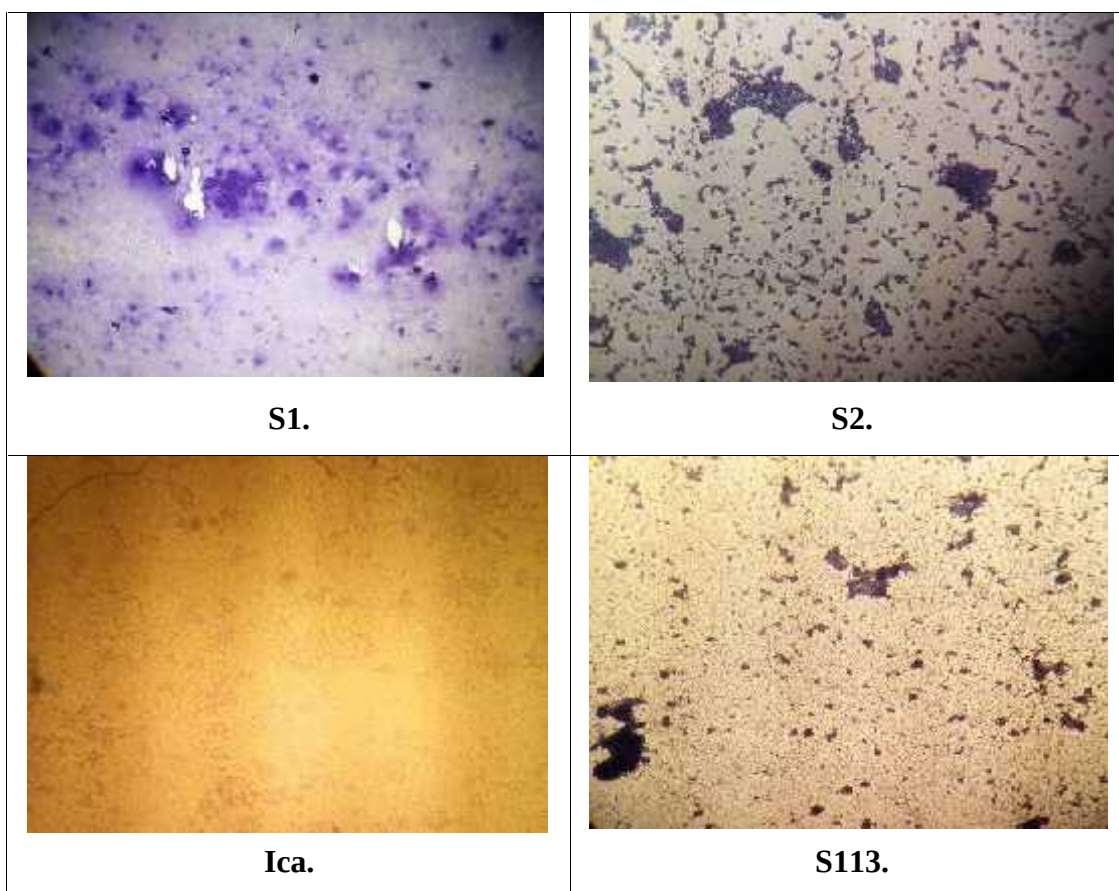


Figure 06. Observation microscopique des souches A1, A2, Sa113 et Ica après coloration de Gram. Grossissement X100

1.3. Test catalase

Le test de catalase étaient positifs pour toutes les souches étudiées A1, A2, Sa113 et Ica (figure07).



Figure 07. Test de catalase : résultat positif

1.4. Test oxydase:

Les staphylocoques étudiés étaient dépourvus d'oxydase puisqu'aucune couleur (rose rouge) n'apparaît dans le milieu donc elles sont oxydases négatives (figure 08).



Figure08. Test d'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 coagulasses positives (figure 09) ce qui confirme d'autant plus leur appartenance à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

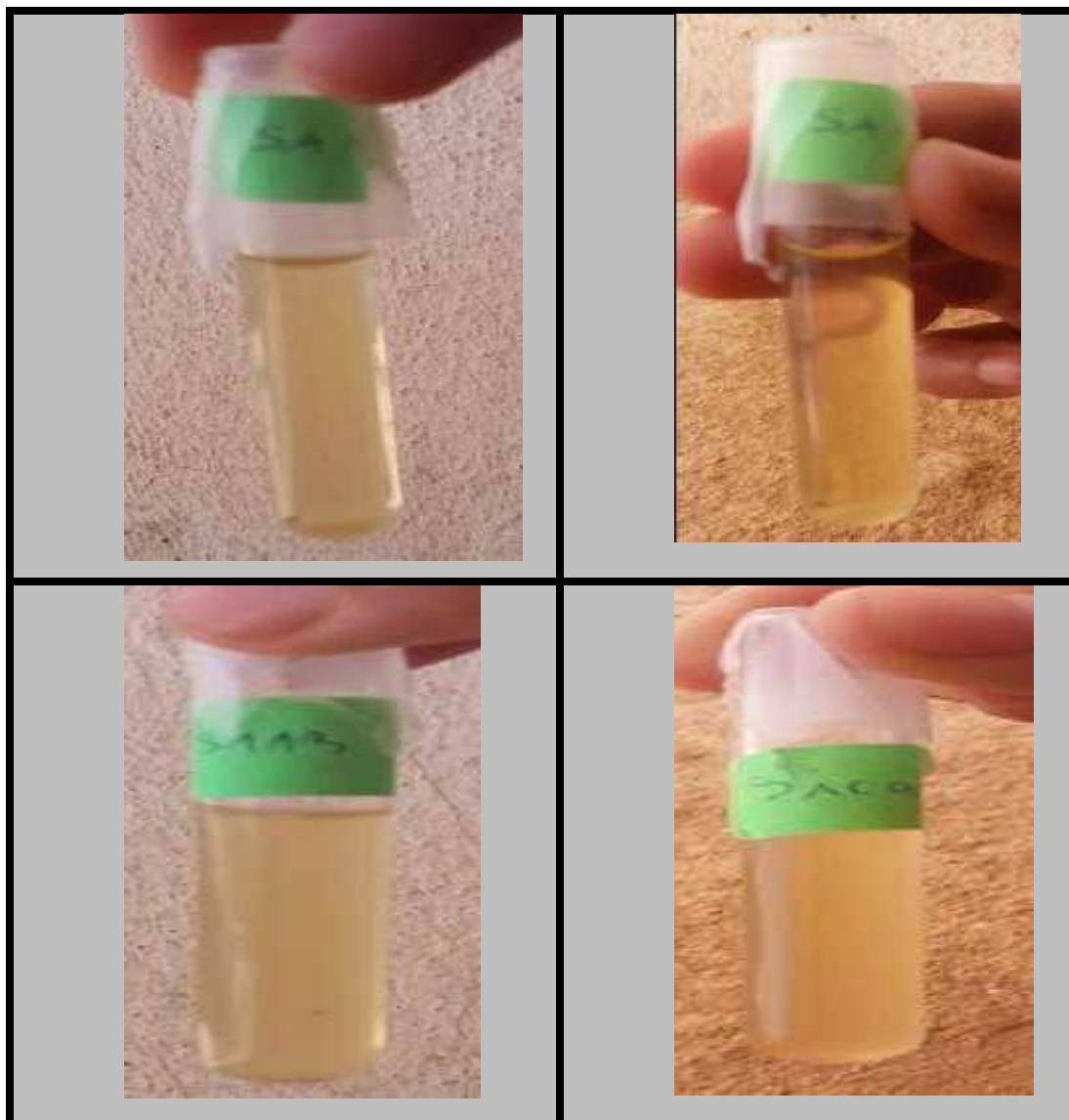


Figure 09. Test de coagulase: Résultat positif

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 10) sont avérés positifs pour toutes les souches testées dans cette étude.

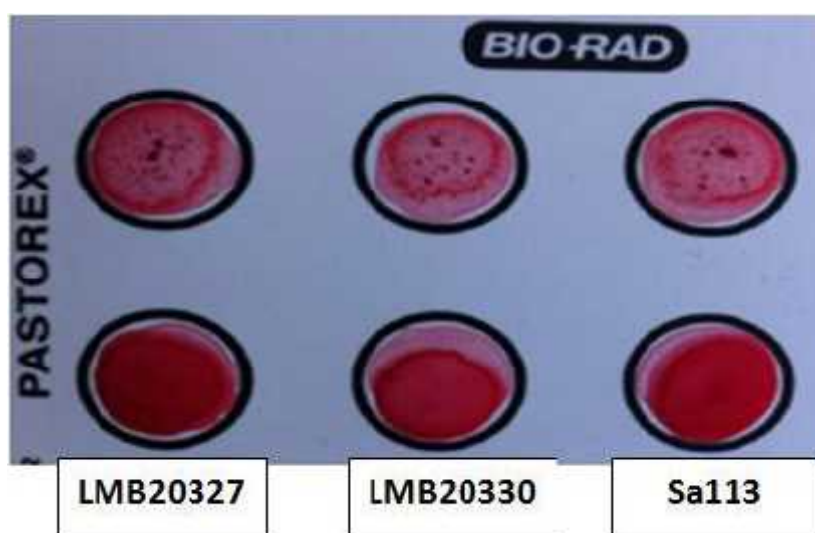


Figure 10. Test pastorex 'Staph-Plus latex agglutination

2. Technique d'évaluation de la formation de biofilm in vitro

Méthode en tubes (TM)

La détermination quantitative de la formation de biofilm chez toutes nos souches a été réalisée par la technique TM

Selon les résultats obtenus les 4 souches sont productrices de biofilm par cette technique dont *S1*, *S2*, *S113* et *S Ica*.

Nous avons effectué 3 essais pour chaque concentration du glucose et du NaCl. Les résultats des mesures de DO par spectrophotomètre à 630 nm sont regroupés dans des tableaux suivants :

Tableau 1 . Valeurs de Densités optiques (630nm) obtenues par la méthode en tubes (TM) pour les souches LMB20330 (A2), LMB20327 (A1), Sa113 et Ica.

Effet du glucose sur le biofilm à *S. aureus*.

Essai 1		0%	1%	3%	5%
	T	0,001	0,004	0,003	0,005
souche A1	1	0,023	0,056	0,054	0,015
	2	0,014	0,06	0,03	0,06
	3	0,019	0,048	0,035	0,03
	T	0,001	0,001	0,001	0,001
Souche S113	1	0,018	0,012	0,01	0,03
	2	0,02	0,022	0,008	0,018
	3	0,016	0,03	0,011	0,049
	T	0,003	0,001	0,002	0,001
Souche Ica	1	0,014	0,01	0,028	0,023
	2	0,015	0,018	0,036	0,018
	3	0,012	0,011	0,015	0,022
Essai 2		0%	1%	3%	5%
	T	0	0,001	0	0,001
Souche A2	1	0,033	0,047	0,054	0,097
	2	0,022	0,01	0,07	0,042
	3	0,016	0,109	0,0102	0,027
	T	0	0	0	0
SoucheS113	1	0,087	0,08	0,047	0,058
	2	0,0107	0,075	0,034	0,08
	3	0,066	0,003	0,038	0,011
	T	0	0	0	0
Souche ICA	1	0,003	0,003	0,002	0,103
	2	0,01	0,005	0,035	0,035
	3	0,003	0,012	0,102	0,036
	3	0,012	0,011	0,015	0,022

Tableau 2 .Valeurs de Densités optiques (630nm) obtenues par la méthode en tubes (TM) pour les souches LMB20330 (A2), LMB20327 (A1), Sa113 et Ica. Effet du NaCl sur le biofilm à *S. aureus*.

Essai 01		0%	1%	4%	7%
	T	0,005	0,001	0,003	0,001
souche A1	1	0,06	0,08	0,045	0,063
	2	0,076	0,09	0,04	0,046
	3	0,05	0,083	0,039	0,05
	T	0,001	0,001	0,001	0,001
Souche S113	1	0,031	0,015	0,008	0,006
	2	0,03	0,008	0,082	0,02
	3	0,025	0,01	0,105	0,025
	T	0,001	0,002	0,003	0,004
Souche Ica	1	0,017	0,051	0,009	0,03
	2	0,023	0,094	0,006	0,053
	3	0,027	0,025	0,013	0,05
Essai 2		0%	1%	4%	7%
	T	0	0	0	0
Souche A2	1	0,015	0,035	0,004	0,006
	2	0,002	0,07	0,014	0,03
	3	0,008	0,015	0,001	0,023
	T	0	0	0	0
Souche S113	1	0,098	0,073	0,09	0,015
	2	0,05	0,078	0,073	0,06
	3	0,013	0,083	0,107	0,046
	T	0	0	0	0
Souche Ica	1	0,014	0,036	0,032	0,032
	2	0,023	0,032	0,024	0,012
	3	0,025	0,065	0,009	0,04

2.1. Effet du glucose sur la formation de biofilm chez *S. aureus*

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

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

Les concentrations de glucoses sélectionnées sont : (0%, 1%, 3% et 5%). 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 glucose sur la production de biofilm chez les souches testées sont représentés par les figures 11,12

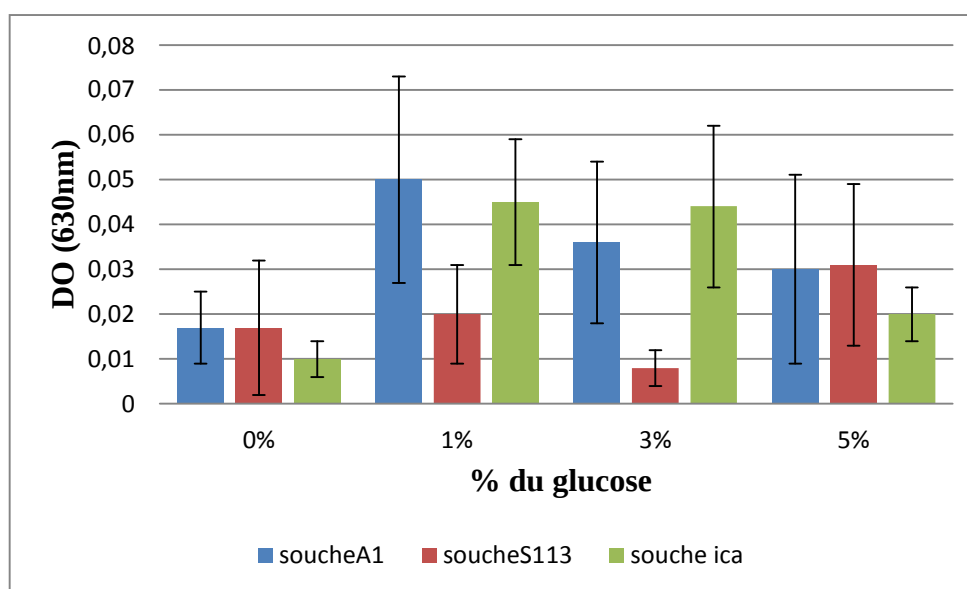


Figure 11. Effet du Glucose sur la formation de biofilm chez les souches A1, S113, Ica

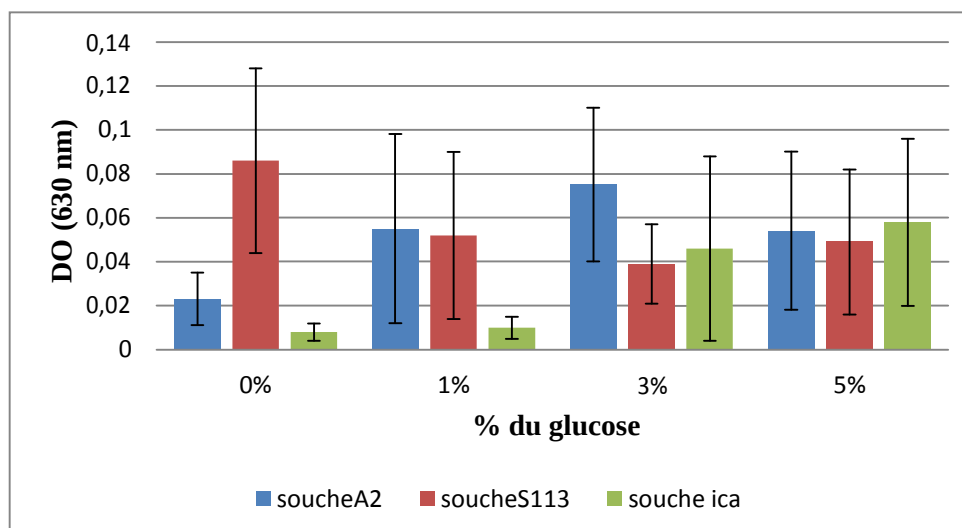


Figure 12. Effet du Glucose sur la formation de biofilm chez les souches A2, S113, Ica

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) ; (Ho  stack   et   i  zn  r, 2007)].

Le but de cette partie de travail est d'étudier l'impact du glucose sur la formation de biofilm chez des souches de *S.aureus*.

Des suspensions bactériennes à différentes concentrations de glucoses (0%, 1%, 3% et 5%) ont été préparées dans du 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 11,12** ont permis de mettre en évidence plusieurs comportements selon les souches à différentes concentrations en glucose.

D'après les résultats obtenus, la plus grande quantité de biofilm était produite à des concentrations de 1% et 3% glucose pour les souches A1 et A2, respectivement. Par ailleurs, on a pu constater que la quantité de biofilm produite en absence du glucose (0%)   tait la plus faible pour ces deux mêmes souches.

Chez la souche S113, les résultats étaient beaucoup plus fluctuants et instables. Dans le premier essai nous avons remarqué que cette souche préférait une concentration élevée en glucose (5%) pour une meilleure production de biofilm alors que dans le deuxième essai le résultat était contradictoire, la souche préférait plutôt un milieu exempt de glucose (0%) pour une formation optimale de biofilm.

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.

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**)].

6. Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez *S. aureus*

Pour évaluer l'impact des conditions environnementales sur la formation de biofilm pour les isolats cliniques, nous avons opté pour la détection de biofilm en utilisant différentes concentrations de NaCl.

Les résultats obtenus sont présentés par les figures (13 et 14) suivantes :

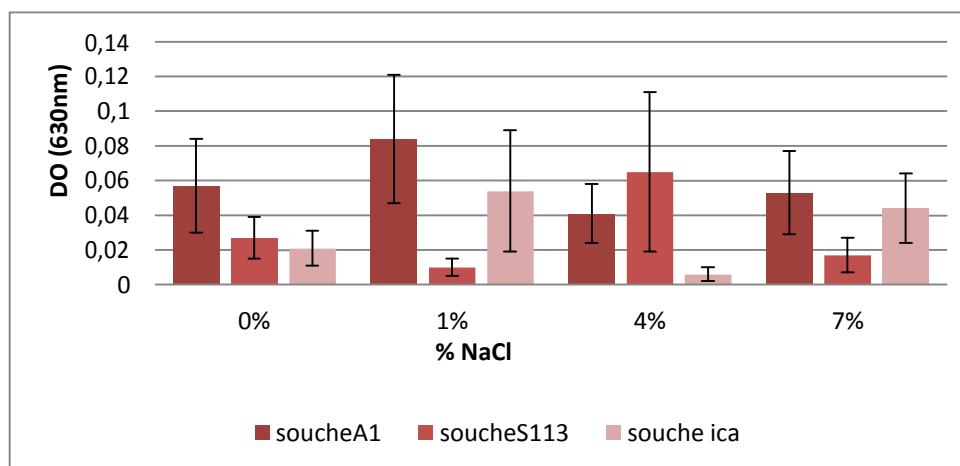


Figure 13. Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez les souches A1, S113, Ica

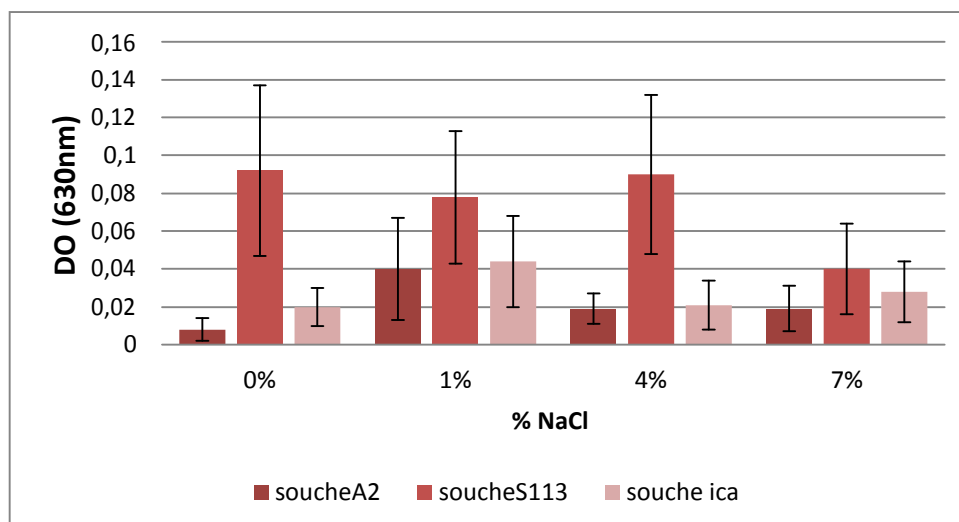


Figure 14. Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez les souches A2, S113, Ica

Selon les histogrammes obtenus, la plus grande quantité de biofilm était produite à une concentration de 1% NaCl pour les deux souches A1 et A2. Par ailleurs, on a pu constater que la quantité de biofilm produite à 4% NaCl et 0% NaCl était la plus faible pour ces deux mêmes souches A1 et A2, respectivement.

Les résultats obtenus pour la souche S113 n'étaient pas stables. La même souche préférait une concentration de 4% en NaCl pour une meilleure production de biofilm (selon l'essai 1) alors que selon le deuxième essai, cette souche préférait plutôt des concentrations en NaCl de 0% et 4% pour une formation optimale de biofilm.

La souche Ica s'est ainsi montr  e productrice de biofilm à différentes concentrations avec une production maximale de biofilm à 1% NaCl. Ce résultat est contradictoire puisque cette souche est non productrice de biofilm. Ceci met en cause les conditions de travail ainsi que la technique (TM) utilisées dans le présent travail.

Selon une étude réalisée par **Lee et al. (2014)** portant sur l'effet du NaCl sur la formation de biofilm à *S. aureus* (ATCC13565) par la méthode TCP (Tissue culture plate) et la microscopie confocale (Confocal laser scanning microscope), il s'est avéré que la formation de biofilm augmentent proportionnellement avec les concentrations de NaCl (0%, 2%, 4%, et 6%). Selon cette même étude l'expression du gène *IcacA*   tait la plus élevée à des concentrations de 4% et 6%NaCl.

Selon d'autres auteurs, plus la concentration en glucose et NaCl augmente, plus la production du biofilm est améliorée chez les souches pathogènes et non pathogènes de staphylocoques (**Agarwal A et Jain A 2013**).

Conclusion

Conclusion

Les infections bactériennes sont la cause majeure de la morbidité et de la mortalité en milieu hospitalier dont la majorité peut être due aux staphylocoques. L'importance médicale de ces espèces bactériennes est leurs capacités à provoquer de nombreux types d'infections chez l'homme et à persister à la surface de dispositifs médicaux. Ces infections aggravées, dues au développement de biofilms à staphylocoques constituent actuellement un vrai problème de santé publique.

Ainsi, l'objectif de ce travail était de connaître les staphylocoques aureus et nous avons effectué quelques tests préliminaires afin de reidentifier les deux souches cliniques de *S. aureus* (LMB20327 et LMB20330) qui nous ont été fournies par l'équipe des Extrêmophiles du laboratoire LAMAABE et d'évaluer leurs potentiel de pathogénicité par l'étude, quantifier et caractériser leur capacité à former des biofilms par techniques TM.

Le glucose et NaCl en milieu semble avoir un effet sur la formation de biofilm ; plus la concentration augmente plus que le taux du biofilm est important.

Sachant que la méthode TM utilisée dans cette étude aboutit parfois à des résultats fluctuants et instables elle ne peut pas être recommandée pour la détection de la formation de biofilms. L'effet du glucose et du NaCl sur la formation du biofilm sur *S.aureus* reste contestable.

Références bibliographique

Références bibliographique

- 1) **Agarwal A et Jain A(2013)**. Glucose & sodium chloride induced biofilm production& ica operon in clinical isolates of staphylococci. Indian J Med Res. 138, 262-266.
- 2) **Alnnasouri M, Dagot C, Pons MN (2010a)**. Les polysaccharides et les polyprotéines de biofilm. Séminaire de l'école doctorale Ressources Procédés Produits (RP2E)-Nancy, France.
- 3) **Annous, B., Fratamico, P. and Smith, J. L.** (2009), —Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do, Journal of Food Science, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.
- 4) **Behlou,I.& Gilmore, M. S.**(2008).Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases.Arch Ophthalmol 126,1572-1581.
- 5) **Beloin C, Roux A. et Svanborg C (2008)**. Echerichia coli, biofilms. Curr Top Microbiol-Immunol 322,249-289.
- 6) **Beloin,C.,Roux,A.& Svanborg,C.**(2005) .Echerichia coli, biofilms.Curr Top Microbiol Immunol 322,249-289.
- 7) **Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J.** (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.
- 8) **Bernard, L.** 2006. Mécanismes physiopathologiques des infections orthopédiques. Rev. Rhumatol. 73: 327-331.
- 9) **Branger A, Richer M-M, Roustel S (2007)**. Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon ; p.131-164.
- 10) **Bury- Moné S (2007)**. Les biofilms. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p
- 11) **Chalvet de Rochemonteix A (2009)**. Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.
- 12) **Characklis WG, Marshall K.C.** (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- 13) **Chmielewski et Frank,** (2003), Biofilm Formation and Controi in Food Processing Facilities, Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety,

- 14) **Christensen BE and Characklis WG. 1990.** Physical and chemical properties of biofilms. In Biofilms. Edited by WG. Characklis & KC. Marshall. New York, Wiley, pp. 93–130
- 15) **Clutterbuck AL, Woods EJ, et al. (2007)** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. Vet Microbiol., Mar 31; 121 (1-2): 1-17]
- 16) **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.
- 17) **Corrigan R.M, Rigby, D, Handley, P. and Foster, T.J (2007)** The role of Staphylococcus aureus surface protein SasG in adherence and biofilm formation. Microbiology (Reading, England) 153, 2435-2446.
- 18) **Costerton J.W.; 1984;** The formation of biocide-resistant biofilms in industrial
- 19) **Costerton JW. Introduction (1999)** to biofilm. Int J Antimicrob Agents ; 11: 217–21
- 20) **Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J. (1978)** How bacteria stick. Scientific American 238, 86-95
- 21) **Couture B. (1990).** Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.
- 22) **Davey, M.E., O'Toole, G.O., (2000),** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Bio! Revs. 64 (4), 847-867.
- 23) **De Chalvet De Rochemonteix A. (2009).** Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Créteil.
- 24) **DECOSTER A. Cours de bactériologie :**
- 25) **Donlan RM (2002).** Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging Infectious Disease journal. 8 (9): 881-890
- 26) **Donlan RM, Costerton JW. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 15: 167-193.
- 27) **El Kouir, D. P. (2003).** Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. EMC, maladies infectieuses , [8-007-A-10].
- 28) **Espinasse, f., Page, B. & Cottard-Bouelle, B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. Revue Francophone des Laboratoires 426, 51-63.

- 29) **Fauchere J.L. and Avril J.L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. ellipses, Paris. 213- 217.
- 30) **Ferron A. (1984).** Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12ème édition. CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.
- 31) **Fitzpatrick F, Humphreys, H. and O'Gara, J.P (2006).** Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Hosp Infect* 62, 120-122.
- 32) **Folkesson, A., Haagenen, J. A. J., Zampaloni, C., Sternberg, C. and Molin, S. (2008).** —Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides, Public Library of Science, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11
- 33) **Foster, T. 1996.** *Staphylococcus*. In: S. Baron, Editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- 34) **Fowler, V.G, Jr, Fey, P.D, Reller, L.B, Chamis, A.L, Corey, G.R. and Rupp, M.E. (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
- 35) **Goller C.C, Romeo T. (2008).** Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 37- 66
- 36) **Gordon L., Cloeckaert A., Doublet B., Schwarz S., Bouju-Albert A., Ganiere J.P., Le Bris H., Le Fleche-Mateos A., Giraud E. 2008.** Complete sequence of the *floR* carrying multiresistance plasmid *pAB5S9* from fresh water *Aeromonas bestiarum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 65–71.
- 37) **Harris, L. G, S. J. Foster et R. G. Richards. (2002).** An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur. Cells Mater.* 4: 39-60.
- 38) **Harris, L. G. et R. G. Richards. (2006).** *Staphylococci and implants surfaces: a review.* *Injury, Int. J. Care Injured* 37: S3-S14.
- 39) **Henerici A., T., (1932),** studies of freshwater bacteria i. a direct microscopic technique, *Journal of bacteriology*,
- 40) **Hiron A. 2007.** Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en Microbiologie. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) .Paris.
- 41) **Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. and Bjarnsholt, T. (2011)**

- 42) <http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>
- 43) **Humphrey BA, Dickson M R and Marshall K C. 1979.** Physiological and in situ observations on adhesion of gliding bacteria to surfaces, Arch. Microbiol., 120: 231
- 44) **Izano E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B. and Kaplan, J.B. (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.
- 45) **Jacobsen,S.M.,Stickler,D.J.Mobley,M.L.&shitoliff,M.E.(2008).**Complicated Catheterassociated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*.Clin Microbiol Rev 21,26-59.
- 46) **Jain, A., Marsili, E. and Bhosle, N. B. (2011),** —The Biofilm Returns: Microbial Life at the Interface, Microbes and Microbial Technology, Springer, New York,
- 47) **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.
- 48) **Klein G. (2011).** Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Bretagne occidentale, Bretagne
- 49) **Kloos W.E. and Veron M. (1990).** Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*» J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.773-794.
- 50) **Kurlenda, J. et M. Grinholc. (2012).** Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. Acta Biochim. Pol. 59:171-184.
- 51) **Lauderdale K.J, Boles B.R, Cheung A.L, and Horswill A.R, (2009).** Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. Infect Immun 77, 1623-1635.
- 52) **Lee S, Choi K-H, Yoon Y (2014).** Effect of NaCl on Biofilm Formation of the Isolate from *Staphylococcus aureus* Outbreak Linked to Ham. Korean J. Food Sci. An. 34 (2),
- 53) **Mai G T, McCormack J G, Seow W K, Pier G B, Jackson L A & Thong Y H. (1993).** Inhibition of adherence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by alginase specific monoclonal antibodies and antibiotics. Infect Immun 61: 4338–4343
- 54) **Mann E.E, Rice, K.C., Boles B.R, Endres, J.L, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang L.H, Smeltze, M.S., Horswill A.R. and Bayles K.W. (2009)**

Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. PLoS One 4, e5822.

- 55) **Marti, M., Trotonda, M.P., Tormo-Mas, M.A., Vergara-Irigaray, M., Cheung, A.L., Lasa, I. and Penades, J.R. (2011).** Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 12, 55-64.
- 56) **Martinez LR, Casadevall A, (2007).** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4592- 4601]
- 57) **Merino N, Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M, Valle, J., Solano, C, Calvo, E, Lopez, J.A, Foster, T.J, Penades, J.R. and Lasa, I. (2009).** Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 191, 832843.
- 58) **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
- 59) **Nielsen P-H, Jahn A and Palmgren R. 1997.** Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci Technol* 36: 11–19.
- 60) **Nobbs, A. H., Lamount, R. J. and Jenkinson, H. (2009),** —*Streptococcus* adherence and colonization, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 73 No. 3, pp. 407-505
- 61) **O'Neill E, Pozzi, C, Houston, P, Smyth, D, Humphreys, H., Robinson, D.A. and O'Gara J.P. (2007a).** Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *J Clin Microbiol* 45, 1379-1388.
- 62) **O'Toole G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- 63) **Otto, M. 2012.** MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.* **14**: 1513-1521.
- 64) **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.
- 65) **Percival S.L, Bowler P.G (2004 a).** Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 16, 234-240.

- 66) **Percival S.L, Bowler P.G. (2004 b).** Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. *World Wide Wounds*.
- 67) **Rice K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S. and Bayles K.W. (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.
- 68) **Romeo T, (2008).** *Bacterial Biofilms*. Springer
- 69) **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.
- 70) **Stanley N.R., Lazazzera B.A., Britton R.A., Grossman A.D. (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarray. *Journal of Bacteriology*. 185: 1951-1957.
- 71) **Stewart, P. S (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107-113
- 72) **Sutherland I (2001).** Biofilm exopolysaccharide: a strong and sticky framework.
- 73) **Tenke,P.Kovacs,B.,Jackel,M.& Nagy,E.(2006).**The role of biofilm infection in urology.*World J Urol* 24,13-20.
- 74) **Tolker- NIELSEN T, Molin S (2000).** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.*, 40: 75-84
- 75) **Tomlin KL, Malott RJ et al (2005).** Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208- 5218
- 76) **Tu Quoc, P.H, Genevaux, P, Pajunen, M, Savilahti, H, Georgopoulos, C, Schrenzel, J, and Kelley, W.L (2007).** Isolation and characterization of biofilm formation defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 75, 1079-1088
- 77) **Vincenot, F., M. Saleh et G. Prévost. 2008.** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Fr. Labo.* **407**: 61-69.
- 78) **Wanner O, Bauchrowitz M. (2006).** Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News* 60 f:4-7.
- 79) **Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* **78**:110-116.

Annexe

Annexe

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

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

2. Gélose nutritive pour la conservation

Composition :

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

pH=7.3

Préparation : prêt à l'emploi en petits tubes fins.

Annexe 02 :

Réactifs de la coloration de Gram

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

Annexe 03 : Réactifs de la méthode TM

Le tampan PBS (Phosphate Buffered Saline)

KH ₂ PO ₄	0, 24 g
Na ₂ HPO ₄	1. 4 g
NaCl.....	8 g
KCl.....	0.2gEau
distillée.....	(qsp) 1 L

Acétate de sodium

Acétate de sodium	2g
Eau distillée.....	100 ml

L'objectif de cette étude était de tester la capacité de deux souches cliniques de *Staphylococcus aureus*, LMB20327 (A1) et LMB20330 (A2) à produire le biofilm à différentes concentrations en glucose (0%, 1%, 3%, et 5%) et en NaCl (0%, 1%, 4%, et 7%) . Les souches de référence Sa113 ATCC35556 (biofilm positif) et Ica (biofilm négatif) ont été utilisées à des fins de comparaison. Pour évaluer la production de biofilm nous avons appliqué la méthode en tubes (TM). Le glucose et le NaCl semblent avoir un effet positif sur la formation de biofilm. Chez les souches A1 et A2 la quantité la plus importante de biofilm était produite à des concentrations de 1% et 3% glucose, respectivement. Ces mêmes souches à 1% NaCl produisaient une quantité importante de biofilm par rapport aux autres concentrations. Sachant que la méthode TM utilisée dans cette étude aboutit parfois à des résultats fluctuants et instables, l'effet du glucose et du NaCl sur la formation du biofilm à *S.aureus* reste à prouver.

: 1 1 1 1

Summary:

The objective of this study was to test the ability of two clinical strains of *Staphylococcus aureus*, LMB20327 (A1) and LMB20330 (A2) to produce biofilm at different glucose concentrations (0%, 1%, 3%, and 5%) and NaCl (0%, 1%, 4%, and 7%). Reference strains Sa113 ATCC35556 (biofilm positive) and Ica (negative biofilm) were used for comparison purposes. To evaluate the biofilm production we applied the tube method (TM). Glucose and NaCl appear to have a positive effect on biofilm formation. In strains A1 and A2 the largest amount of biofilm was produced at concentrations of 1% and 3% glucose, respectively. These same 1% NaCl strains produced a significant amount of biofilm compared to other concentrations. Knowing that the TM method used in this study sometimes leads to fluctuating and unstable results, the effect of glucose and NaCl on the formation of *S. aureus* biofilm remains to be proven.

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilm, glucose, NaCl