RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ YAHIA FARES MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE VIE

MÉMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité : ***Microbiologie Appliquée***

THEME

Pouvoire de formation de Biofilm et auto-aggrégation chez *S.aureus* d'origine animale

Présentée par :

-Melle : HAFSAOUI MANAR

-Melle : BEN YAZID HADJER

-Melle : MESSAOUDANE NOUR EL AMEL

Devant le jury composé de:

Mr: FOUDIL MOHAMMED	MCB	université Médéa	Promoteur
Mr: NABI IBRAHIM	MCB	université Médéa	Examinateur I
Mr: AIT MOUHEB HOCINE	MCB	université Médéa	Examinateur II

Année Universitaire 2022 / 2023

Remerciement:

Nous remercions tout d'abord dieu pour tous ces dons et pour avoir la capacité d'élaborer ce travail. Et qui nous a dirigé tout droit vers le bon chemin et nous a donné la volonté, la santé et la patience pour atteindre nos buts.

Nous tenons particulièrement à remercier notre promoteur et directeur de mémoire ***Mr FOUDIL.M,*** *pour avoir accepté la charge de nous encadré. Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour vos précieux conseils et remarques.*

Nos sincères remerciements vont également aux jurys.

Mr NABI. Mr AYT MOUHEB

Je ne saurai terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont

dans l'ombre et dont la contribution à mon travail est non négligeable

notamment les ingénieures de laboratoire d'université YAHIA Fares Médéa et ***Mr ABD ELLAH*** *De département SNV.*

Aux tous les vétérinaires qu'ils nous aident, Un grand merci pour

Vous soutien surtout.

Merci, a ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon

Dédicace :

Dédicace Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut… Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance… Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce travail à :

Ma chérie mère : M. CHERGUI

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés.

Mon chéri père : BACHIR

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.

Recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond amour. Puisse le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour

***Mes très chères sœurs et mon cher frère**:*

Romaissa, Meriem, Amira et Mohamed Abd el waheb

qui sont toujours présente pour moi dans les moments de quiétude et dans les moments difficiles.

***A mon fiancé : SALAH EDDINNE.BOU :** qui m'a supporté..., les mots me suffisent pas pour exprime tout l'affection j'éprouve pour toi, merci beaucoup.*

*Mon binôme et ma copine **Manar H** je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments qu'on a passés ensemble. Et ma chéré trinôme HAJER.B merci pour partager avec moi les moments difficiles de ce travail..*

***A mes amis proches : RANIA et ICHRAK** : avec les quelle j'ai ressenti le plaisir de travailler tout aulong de ce parcours*

A tous l mes oncles et mes tantes et leurs familles

*(la famille **MESSAOUDENE** et la famille **CHERGUI**)*

Nour El Amel

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.

A mon très cher père: EL Tayeb

je lui dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'il m'a tant réservé, je suis très reconnaissante Merci papa

Puisse le bon dieu vous garde et vous procurer santé et langue vie

A La personne la plus chère à mon cœur: DJAMILA

Maman qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie, Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi; je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté. Tu m'as aimé très profondément et tu as été toujours une mère idéale. Tu es la seule qui comprend ma vie : Je te demande pardon et encore une fois Merci.

A ma chère sœur HODNA et mon seul frère cher à mon cœur MOHAMED EL BACHIR

Je vous souhaite un avenir plain de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité

A ma grande mère et mes tantes HOUDA, ILHAM ET WIDAD.

Une grande merci spéciale à mon binôme NOUR EL AMEL.M *ceux qui m'ont encouragés et insufflé en moi l'espoir et la volonté ....Et ma chère trinôme HAJER.B merci pour partager avec moi les moments difficiles de ce travail.*

A mes amis proches : RANIA, ICHRAK MOUNOIA et KHADIJA *: avec les quelle j'ai ressenti le plaisir de travailler tout au long de ce parcours*

A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.

MANAR

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail

A mon très cher père Yahia, Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être, tu as été un papa extraordinaire rien ne pourront te remplacer.

Que dieu te procure bonne santé et longue vie

A ma très chère mère Sabrina

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mes belles sœurs Soundous et Malak qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mon adorable petit frère Mohamed Riadh qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A mes grands-parents, mes oncles et mes tantes Surtout la plus belle tante Malika. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A tous les amis et les voisins que j'ai connu jusqu'à maintenant. A tous ma famille maternelle et paternelle .merci pour leurs amours et leurs encouragements.

A mes chers binôme dans ce mémoire : Manar et Nour el amel, qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je vous dis merci.

Hadjer

Résumé :

Un biofilm est une communauté multicellulaire plus ou moins complexe, qui constitue un mode de vie protégeant les bactéries et les rends résistantes aux antibiotiques. *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène opportuniste chez l'homme et l'animale et capables de former des biofilms, et causer des infections chronique ou récidivantes. Dans le but d'étudier le pouvoir de formation de biofilm chez *S.aureus* d'origine animale, et l'étude l'effet de l'inoculum, ainsi que celui de NaCl(2% et 6%), des souches de *S.aureus* (n= 23) ont été isolées de trois espèces animale : les ovins, les caprins est les chats, dans les régions de : Ksar chellala, Ksar el Boukhari et Berrouaghia. L'antibiogramme a révélé une résistance élévés envers la pénicillin (73.91%), suivie par Tétracycline (30.43%), suivie par Cefoxitine (21.73%). La technique de culture de plaque (TCP) a été utilisé pour étudier le pouvoir de formation de biofilm, .Toutes les souches se montrent capable de formerun biofilm, avec un taux de 30.42% comme fortes formatrices et 69.43% étaient moyennement formatrice, et pour l'effet de L'inoculum sur la formation de biofilm , un innoculum de 0.5 Mcf a accentué la formation de biofilm chez toutes les souches, suivi par l'innoculum1/100, et en fin le 0.5 mcf diluée à 1/100 qui donne les résultats le plus faibles.puisle NaCl a augmenter la formation de biofilm de 46% pourNACL 2%, et 86% pour nacl6%.une étude statistique est réalisée en fin pour comparer la formation de biofilm chez les souches des trois espèces animale dans les différentes conditions, et finalement aucune relation a été trouvée entre la formation de biofilm et le test d'auto agrégation chez *S.aureus*par test de corrélation.

Mots clés : Biofilm, *staphylococcus aureus*, TCP, Auto-aggrégation , Antibiogramme .

Summary:

A biofilm is a more or less complex multicellular community, which constitutes a way of life that protects bacteria and makes them resistant to antibiotics. Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogenic bacterium in humans and animals, capable of forming biofilms and causing chronic or recurrent infections. In order to study the biofilm-forming capacity of S.aureus of animal origin, and the effect of inoculum, as well as that of NaCl (2% and 6%), S.aureus strains (n= 23) were isolated from three animal species: sheep, goats and cats, in the regions of : Ksar chellala, Ksar el Boukhari and Berrouaghia. Antibiotic susceptibility testing revealed high resistance to penicillin (73.91%), followed by tetracycline (30.43%) and cefoxitin (21.73%). The plate culture technique (TCP) was used to study the biofilm-forming capacity of all strains, with a rate of 30.42% as strong formers and 69.43% as moderately formers, and for the effect of inoculum on biofilm formation, 0.5 Mcf innoculum enhanced biofilm formation in all strains, followed by 1/100 innoculum, and finally 0. 5 mcf diluted to 1/100 gave the lowest results.then NaCl increased biofilm formation by 46% forNACL 2%, and 86% for nacl6%.a statistical study was carried out at the end to compare biofilm formation in strains of the three animal species under the different conditions, and finally no relationship was found between biofilm formation and the self-aggregation test in S.aureusby correlation test.

Keywords: Biofilm, *staphylococcus aureus,*TCP, Auto-aggregation, Antibiogram.

ملخص :

البيوفيلم عبارة عن مجتمع متعدد الخلايا معقد إلى حد ما ، والذي يشكل طريقة حياة تحمي البكتيريا وتجعلها مقاومة للمضادات الحيوية. المكورات العنقودية الذهبية هي بكتيريا انتهازية ممرضة في البشر والحيوانات قادرة على تكوين الأغشية الحيوية والتسبب في التهابات مزمنة أو متكررة. من أجل دراسة قوة تكوين الأغشية الحيوية في بكتريا المكورة العنقودية البرتقالية من أصل حيواني ، ودراسة تأثير اللقاح ، وكذلك تأثير كلوريد الصوديوم (٪2 و 6٪) ، سلالات المكورات العنقودية الذهبية (العدد = 23) من ثلاثة أنواع حيوانية هي الأغنام والماعز والقطط في مناطق: قصر الشلال ، قصر البخاري ، البرواقية. أظهر المضاد الحيوي مقاومة عالية للبنسلين (73.91٪) ، يليه التتراسيكلين (30.43٪) ، يليه سيفوكسيتين (21.73٪). تم استخدام تقنية الاستزراع الصفيحي (TCP) لدراسة قوة تكوين الأغشية الحيوية.أثر اللقاح على تكوين الغشاء الحيوي الرقيق ، وهو حشو من 0.5 Mcf، أبرز تكوين الأغشية الحيوية في جميع السلالات ، تليها اللقاح 100/1 ، وأخيرًا 0.5 Mcf المخفف إلى 100/1 مما يعطي أضعف النتائج ، ثم زاد كلوريد الصوديوم من تكوين الأغشية الحيوية بنسبة 46٪ لـ NaCl٪2 ، و 86٪ لـ NaCl٪6 ظروف مختلفة ، وأخيراً لم يتم العثور على علاقة بين تكوين الأغشية الحيوية والذات. اختبار التجميع في بكتريا المكورة العنقودية البرتقالية عن طريق اختبار الارتباط.

الكلمات الرئيسية: الأغشية الحيوية ، المكورات العنقودية الذهبية ، TCP ، التجميع التلقائي ، المضاد الحيوي.

SOMMAIRE

Sommaire

La liste de Figure :

Figure 1 : Staphylococcus aureus après coloration de Gram (**Joshi LR et all, 2014**)…….05

Figure 2 : Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus*……..06

Figure 3 : Développement d'un biofilm bactérienne **(Lebeaux D, Ghigo J.M (2012)……23**

Figure 4 : Rôle de l'auto-agrégation dans la formation de biofilm**…….27**

Figure 5 : Organigramme représentant les étapes de l'étude……31

Figure 6 : Schéma récapitulatif d'isolement et Identification Biochimique de Staphylococcus aureus…….32

Figure 7 : Conservation des souches isolées dans de BHIB glycérolé (25%) à-20……..33

Figure 8 : Les zones inhibition (antibiogramme)……..37

Figure 9 : Les étapes de préparation de microplaque pour le test BIOFILM+la lecture…..40

Figure 10 : Les étapes de préparation pour le test auto-agrégation **……..43**

Figure 11 : Après incubation de 24h **…….44**

Figure 12 : Aspect morphologique des colonies du *S.aureus* en culture dans Chapman**…...44**

Figure 13 : Aspect morphologique des colonies du S. aureus en culture En Gélose nutritive…….....45

Figure14 : Aspect morphologique des colonies du *S. aureus* en culture dans Gélose au sang……..45

Figure 15 : S. aureus sous microscope coloration de Gram (Gx1**00)…….45**

Figure 16 : La mise en évidence de la catalase chez les Staphylococcus aureus**……46**

Figure 17 : La mise en évidence de la coagulasse libre chez les *S. aureus*…….46

Figure 18 : Mise en évidence de l'ADN ase……46

Figure 19 : profile de résistance aux antibiotiques des souches de staphylococcus aureus isolées……47

Figure20 : profile de sensibilité et de résistance aux antibiotiques des souches de staphylococcus aureus isolées**…..…….47**

Figure 21 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches isolées par *Staphyloccocus aureus*……....49

Figure 22 : Distribution des souches S. aureus formatrice de biofilm inoculum dilué 1/100 en %.....50

Figure 23 : L'effet de L'inoculum sur la formation de biofilm chez les *S.aureus*……...52

Figure 24 : Effet du Na Cl à 0%.....54

Figure 25 : Effet du Na Cl à 2%.....55

Sommaire

Figure 26 : Effet du Na Cl à 6%.....56
Figure 27 : Effet du Na Cl sur la formation de biofilm chez Staphylococcus aureus……..57
Figure 28 : L'observation de croissance de biofilm de *S.aureus* sous microscope Optique…….59
Figure 29 : Pourcentage de l'auto agrégation des souches de *S.aureus*……...**60**
Figure 30 : Corrélation entre le biofilm et auto agrégation des souches *S. aureus*……..61

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Classification de *S. aureus* **……05**
Tableau02 : les souches isole a partir *S.aureus*.....*29*
Tableau03 : Liste d'antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme……..38
Tableau04 : Les catégories de biofilms en fonction de densité optique **……...40**
Tableau05 : Profil de sensibilité et de résistance aux antibiotiques……..48
Tableau06 : Distribution des souches S .aureus formatrice de biofilm d'origine animal en %.....50

Liste des abréviations et signes utilisés :

ATB: Antibiotique.
ADN : Acide désoxyribonucléique.
BHIB: Brian-Heart Infusion Broth (bouillon cœur-cervelle).
CBA : Columbia Blood Agar.
CV: Cristal violet.
CN : Gentamicine.
DO: Densité optique.
DNAse: Désoxyribonucléase.
EDS: Eau distillée stérile.
E: Erythromycine.
GN: Gélose nutritif.
G: Gramme.
GEN: Gentamycine
GRAM(+): Gram positif
H2O2: peroxyde d'hydrogène
H : Heure.
Kcl: Chlorure de potassium.
MSA: Mannitol-Salt-Agar

Sommaire

MH: Mueller Hinton

Min: Minute.

ML: Millilitre.

NaCl: Chlorure de sodium.

nm: Nanomètre.

O2: Dioxygène

PBS : Phosphate buffer saline.

pH: Pression Hydrogén

PFL : Plasma Frais de Lapin

PEN: Pénicilline

R: résistance

S: Sensible

S.aureus*: Staphylococcus aureus*

TCP : Plaque de Culture de Tissus

TE : Tétracyclines

µl: Microlitre

Tables de matière

Introduction 01

Partie I : Etude bibliographique.

Chapitre I : *Staphylococcus aureus*.

1. Intoduction ……...03

2. Définition.....03

3. Historique.....04

4. Habitat et épidémiologie.....04

5. PositionTaxonomique.....04

6. Etude bactériologique.....05

6.1. Caractères morphologiques.....05

6.2. Caractère culturaux.....06

6.3. Caractères biochimiques.....06

7. Facteurs de virulence.....06

7.1. Toxines.....07

Sommaire

7.1.1. Toxine du syndrome de choc toxique ou TSST-1.....07

7.1.2. Les entérotoxines (A, B, C, D, E et F).....07

7.1.3. Exfoliatines.....07

7.2. Les hémolysines (alpha, bêta, delta, gamma).....08

7.3. Exoenzymes.....08

7.3.1. La protéase.....08

7.3.2. Lipase et les phospholipases.....08

7.3.3. Hyaluronidas.....08

7.3.4. Le coagulase libre (protéine extracellulaire).....08

8. Les adhésines.....08

8.1 Protéine A ou Spa.....08

9. Quelque pathologie causée par *S. aureus* chez l'animal *09*

9.1. Chez l'animal.....09

9.1.1. Chez les bovins 09

9.1.2. Chez les petits ruminants.....10

9.1.3. *S. aureus* chez les lapins.....10

9.1.4. *S. aureus* chez les poulets et autres volailles.....10

9.1.5. *S. aureus* chez Animaux de companie.....10

9.1.6. *S. aureus* Chez le cheval.....11

9.1.7. Les Mammites satphylococcique.....11

10. Le biofilm chez *Staphylococcus aureus* 11

Chapitre II : **Les biofilms**.....

1. Qu'est-ce qu'un biofilm ?.....13

2. Les Etapes de la formation d'un biofilm.....13

2.1. Adhésion réversible.....13

2.2. Adhésion irréversible.....14

2.3. Formation de micro-colonies.....14

2.4. Accumulation des microcolonies.....14

2.5. Maturation du biofilm.....14

2.6. Détachement et dispersion du biofilm.....15

3. Régulation de la formation d'un biofilm.....16

3.1. Le quorum sensing.....16

3.2. Les molécules impliquées dans le quorum sensing.....16

Sommaire

3.3. Rôle du quorum sensing.....16
4. Structure et composition du biofilm.....16
4.1. Les microorganismes.....17
4.2. La matrice.....17
4.3. L'organisation.....17
5. Avantages et conséquences du mode de vie en biofilm.....17
5.1. Coopérations métaboliques et échanges d'informations au sein du biofilm.....17
5.1.1. Coopération métabolique.....17
5.1.2. Signalisation au sein du biofilm.....18
5.2. Transfert d'information génétique au sein du biofilm.....18
5.3. Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement.....18
6. Facteur favorisant la formation de biofilm.....19
6.1. Types de surface.....19
6.2. La rugosité de la surface.....19
6.3. Les propriétés physico-chimiques de la surface 19
6.4. Présence de films protéiques sur la surface.....20
6.5. Caractéristiques du milieu.....20
6.5.1. Température.....20
6.5.2. pH.....20
6.5.3. Sources de carbone disponibles.....20
6.5.4. Concentrations en nutriments.....21
6.5.5. Concentrations en certain cation.....21
6.5.6. Forces hydrodynamiques.....21
7. Biofilm chez *S.aureus*.....21
7.1. Effet des conditions environnementales sur la formation de biofilm *S. aureus*....22
7.1.1Composition de milieu de culture.....22
7.1.2 Pression osmotique..... ...23
7.1.3. Acidité et alcalinité du milieu de culture.....23
7.1.4Autres facteurs.....23

Chapitre III : Auto-aggrégation.

1. Définition.....24
2. Effecteurs d'auto-agrégation.....24
2.1. Fimbriae.....24

Sommaire

2.2. Macromolécules sécrétées.....24.
3. Modulation de l'auto-agrégation.....25
4. Mettre à nu la confusion : les phénotypes associés à l'auto-agrégation.....25
5. Bénéfices évolutifs de l'auto-aggrégation aux bactéries.....26
5.1. Colonisation de niche/hôte.....26
5.2. Reconnaissance de la parenté.....26
5.3. Survivre au stress environnemental.....26
6. Inconvénients sélectifs de l'auto-aggrégation dans la pathogenèse de la maladie.....26
7 .Auto-aggrégationt biofilm.....27
Partie II : Matériel et méthode.
1. Le matériel biologique.....29
2. Le protocole de prélévement.....29
2.1. Écouvillonnage nasale.....29
2.1.1. Matériel de prélèvement.....29
2.2. Technique de prélèvement du lait.....29
2.2.1. Matériels de prélèvements.....30
3. Ensemencement (culture).....33
3.1 .Enrechissement.....33
3.2 .Isolemement.....33
4. Purification et conservation.....33
4.1. Revivification des souches.....34
5. Identification des souches.....34
5.1 Identification morphologique.....34
5.1.1 Examen macroscopique.....34
5.1.2 Examen microscopique.....34
5.2 Identification biochimique.....35
5.2.1 La catalase.....35
5.2.2 La coagulase.....35
5-2-2-A-Coagulase libre.....35
5-2-2-B-Comment faire Le test de la coagulase en tube.....36
5.2.3 DNase Test.....36
6- Test de sensibilités aux antibiotiques 36
7-Etude la formation de biofilm in vitro.....38

Sommaire

7.1. la technique utilisé(TCP)....38
7.1.1. Condition de choix de technique....38
7.1.2. Protocol de technique TCP....39
7.1.3. Effet de l'inoculum....39
7.1.4. Principe de lecture sur TCP....40
7.2. Inoculum départ 0.5Mcf....40
7.3. Inoculum départ 0.5Mcf est dilué 1 :100....41
8. observation de biofilm par microscope optique 41
8.1. Protocole de coloration....41
9. Evaluation de l'effet de NaCl sur le pouvoir de formation du biofilm....42
10. Auto-aggrégation....42
11. Analyses statistiques 43
Partie III : **Résultat et discussion**.
1. Répartition des prélèvements....44
2. Identification de S. Aureus....44
2.1. Identification morphologique....44
2.1.1. Aspect macroscopique....44
2.1.2. Aspect microscopique....45
2.2 Identification biochimique....45
2.2.1 Test de catalase....45
2.2.2. Test de coagulase....46
2.2.3. Test Dnase. 46
3. Les résistances des souches de staphylococcus aureus aux antibiotiques....47
4. Technique de plaque de culture....50
5. L'effet de l'inoculum sur la formation de biofilm....53
6. Evaluation de NaCl sur la formation de biofilms de Staphylococcus aureus....54
7. Observation de Biofilm par Microscope Optique....59
8. Test d'auto agrégation....60
9. Relation entre le biofilm et auto aggrégation 61

INTRODUCTION

Introdudction

Introduction :

Staphylococcus aureus est à la fois un commensal et un agent pathogène chez l'homme et de nombreuses espèces animales, où on le trouve couramment sur la peau et les muqueuses (**Muyiwa et *al,* 2015**). Il est omniprésent dans les milieux environnementaux et résiste longtemps. Les staphylocoques peuvent provoquer une grande variété de maladies allant des maladies bénignes telles que les infections cutanées à des infections graves et potentiellement mortelles telles que l'endocardite, la pneumonie et la septicémie chez l'homme. Chez les animaux, *Staphylococcus aureus* est une bactérie courante qui cause la podriasis des bourdons chez les volailles et la mammite chez les vaches laitières **(Gavin et *al*, 2014**). Certaines souches peuvent également provoquer des intoxications alimentaires chez L'homme lorsqu'elles produisent des entérotoxines dans les aliments **(Morandi et *al,* 2010).**

Les infections bactériennes chez l'homme et l'animal causées par des bactéries associées aux biofilms sont un véritable problème de santé publique **(Kodjikian et *al,* 2005).** Les biofilms bactériens sont un mode de vie qui permet aux bactéries de survivre dans des environnements difficiles grâce à leur plus grande tolérance aux microbicides et à la réponse immunitaire de l'hôte par rapport aux formes de bactéries libres ou planctoniques. Les bactéries capables de former un biofilm peuvent entraîner des complications cliniques, **(Goetzet *al,* 2016)**.

Les staphylocoques ont la capacité de former des « biofilms » qui adhèrent à une variété de surfaces vivantes ou non vivantes et sont directement impliqués dans la pathologie. On pense maintenant qu'environ 70 maladies infectieuses chroniques chez les animaux et l'homme sont associées à la formation de biofilms **(Bourgeois et *al*, 1996**).

Staphylococcus aureus est un pathogène humain opportuniste majeur et l'une des espèces staphylococciques pathogènes les plus importantes en médecine vétérinaire. *Staphylococcus aureus* est dangereux car il peut nuire à la santé animale et peut être transmis des animaux aux humains et vice versa. Par conséquent, cela a un impact énorme sur la santé et le bien-être des animaux et entraîne des pertes économiques importantes dans la production animale **(Peton V et *al*, 2014)**.

L'auto-agrégation a été identifiée comme l'une des premières étapes de l'assemblage du biofilm **(Trunk et *al*, 2018).** Contrairement aux biofilms, les agrégats de cellules bactériennes ne sont pas nécessairement attachés aux surfaces, mais flottent librement. Ils sont également généralement plus petits que les biofilms typiques et ne forment pas les tours en forme de champignon observées dans la croissance du biofilm in vitro **(Bjarnsholt et *al,* 2013).**

Introdudction

Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'agrégation cellulaire de *S.aureus* et de l'impact de l'agrégation sur l'activité antimicrobienne facilitera le développement de nouvelles stratégies antiseptiques et thérapeutiques. Jusqu'à présent, les mécanismes d'agrégation chez les bactéries reposent principalement sur des phénomène biologiques tels que le quorum sensing, la réponse au stress, la pression prédatrice ou les interactions homotypiques entre la surface des bactéries et/ou des protéines et des molécules hôtes exogène**s (Trunk, T et *al,* 2012) ; (Crosby et *al,* 2016).**

Objectif :

Les objectifs de ce travail étaient :

1-L'étude de pouvoir de formation de Biofilm chez *staphylococcus aureus* d'origine animal, on déterminant le potentiel de formation par détection de Biofilm in vitro avec la technique de plaque de culture (TCP) par déférente inoculum, et exploration de l'effet de Nacl sur la formation de biofilm.

2- évaluer la relation entre le Biofilm et l'auto-agrégation chez *staphylococcus aureus*.

3- Déterminer la sensibilité aux antibiotiques chez les souches isolés

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur

Staphylococcus aureus

1. Introduction :

Staphylococcus aureus est à la fois un commensal et un agent pathogène chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales, il est généralement présent sur la peau et les muqueuses **(Muyiwa et *al,* 2015).** Elle a donc un impact énorme sur la santé et le bien-être des animaux et entraîne des pertes économiques importantes dans la production animale **(Peton V et *al,* 2014).** Il est ubiquitaire et résiste pendant longtemps dans le milieu environnemental. Le staphylocoque peut causer diverses maladies allant de maladies mineures qui sont des infections cutanées à des infections graves et potentiellement mortelles comme l'endocardite, la pneumonie et la septicémie chez l'homme. Chez l'animal, S. aureus est un germe habituel responsable de la maladie du pied bourdon chez la volaille et des mammites chez le bovin laitier **(Gavin et *al,* 2014).**

Certaines souches sont également responsables de l'intoxication alimentaire humaine lorsqu'ils produisent des entérotoxines dans les denrées alimentaires **(Morandi et *al,* 2010).**

Les infections bactériennes chez l'homme et les animaux causées par des bactéries associées à des biofilms constituent un véritable problème de santé publique **(Kodjikian et *al,* 2005).**

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

Les Staphylocoques ont une aptitude à former des « biofilms » adhérant à des surfaces très diverses, avec une implication directe en pathologie humaine. Actuellement, il est considéré qu'environ 70% des infections chroniques animale et humaine sont en lien avec la formation de biofilm **(Bourgeois et al, 1996).**

2. Définition:

Staphylococcus aureus, autrement appelé Staphylocoque à coagulase positive, est une bactérie à gram positif. C'est un coccus, de forme arrondie, qui se présente sous la forme de diplocoques (des Coccis associés par deux) ou sous la forme d'amas ayant la forme de grappes de raisin **(JP. Flandrois et *al,* 2000).** *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène opportuniste majeur chez l'homme et l'une des espèces de *Staphylococcus* pathogènes les plus importantes en médecine vétérinaire **(Vincent Peton, Yves Le Loir, 2014).**

3. Historique :

En 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine **(Fasquelle, R., 1974).** Plus tard ; en 1883, Ogston a été le premier auteur à différencier deux types de coques pyogènes: un premier groupe arrangé en groupe ou amas appelé « Staphylococcus » et un second groupe organisé en chaînette nommé « Streptococcus» **(Berche, P et *al*, 1988.)**

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

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

4. Habitat et épidémiologie :

Staphylococcus aureus est un germe opportuniste commensal, ubiquitaire, très résistant dans le milieu extérieur, son habitat naturel est l'épithélium squameux humides des narine antérieurs. Environ 20% de la population humaine sont porteurs de S. aureus en permanence dans leur nez et 60% des individus sont des porteurs intermittents. La capacité de *S. aureus* à coloniser l'épithélium nasal est en partie due à l'expression de certains facteurs d'agglutination des protéines de surface ainsi que certains déterminants de surface qui favorisent l'adhésion aux cellules épithéliales desquamées présentes dans la partie antérieure du vestibule nasal. Toutefois, d'autres composants de la surface cellulaire pourraient également y contribuer **(Corigan, R.M et *al,* 2009)**. *S. aureus* peut également coloniser d'autres sites tels que le tractus gastro-intestinal, le pharynx, les aisselles ; elle est aussi retrouvée dans l'environnement (air, eau, sol), ainsi quelles produits alimentaires **(Kluytmans et al, ,1997).**

5. Position taxonomique:

Staphylococcaceae constitue la 4eme famille des Bacillales, celles-ci comprend un seul genre; *Staphylococcus* (GC%= 30-39).Cinquante espèces et sous espèces ont été identifiées au sein du genre *Staphylococcus*. Ce genre est divisé en deux groupes sur la base de la présence d'une coagulase (SCP) et (SCN), on distingue : *Les Staphylocoques* à coagulase positive (SCP) dont le chef fille est *Staphylococcus aureus,* **(LE LOIR Y, GAUTIER M. (2010).**

Tableau 01 : Classification de *S. aureus* :

Domain	Bacteria ou Eubactia
Phylum	Firmicutes
Classes	Bacilli
Order	Bacillales
Families	Staphylococaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	Staphylococcus aureus

6. Etude bactériologique:

6.1. Caractères morphologiques:

Les S. aureus sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en diplocoques ou le plus souvent en amas plan de plusieurs éléments du (grec staphylo grappe de raisin), mesurant de 0,5 à 1,5µ de diamètre. Comme chez la majorité des bactéries Gram positives, l'enveloppe de S. aureus est composée d'une seule membrane plasmique recouverte d'une paroi épaisse riche en peptidoglycane et en acides téichoïques .Le staphylocoque doré est sporulée, immobile et 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 **(Le Minor et *al,* 1990).**

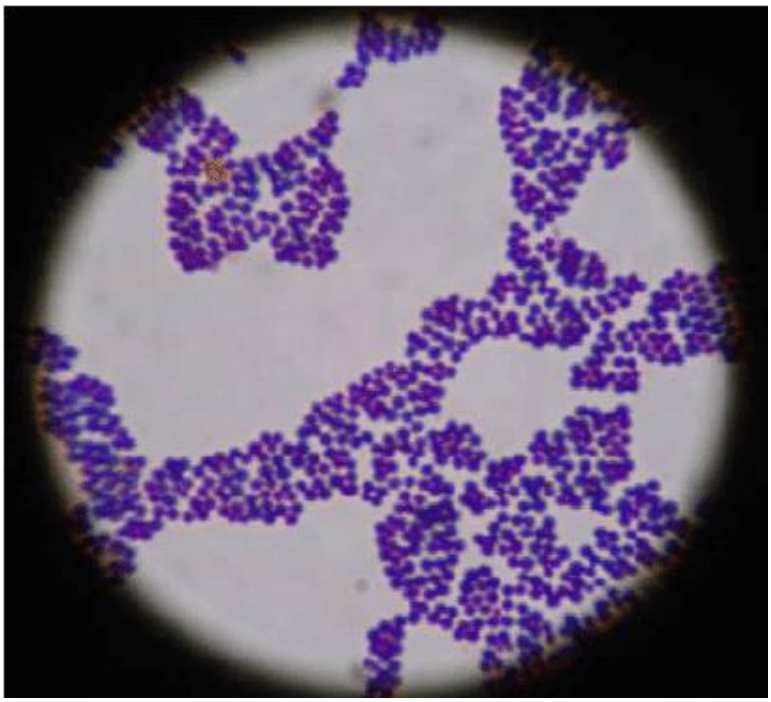


Figure1:*Staphylococcus aureus* après coloration de Gram **(Joshi LR et al, 2014).**

6.2. Caractère culturaux:

S. aureus cultive facilement sur les milieux usuels (Gélose nutritive, bouillon nutritif…),se cultive également sur gélose au sang et le milieu sélectif Chapman.

Il est thermosensible le fait qu'il est ralenti par le froid et tué par des températures élevées détruit à 58°C pendant 60 minutes **(LE MINOR L et VERON M. 1982)**. C'est une bactérie mésophile (37°C de croissance optimale), neutrophile (pH 7 optimal) et halophile (tolérant vis-à-vis de hautes concentrations en sel, par exemple en bouillon hyper salé à 7% de NaCl et certaines souches peuvent croitre jusqu'à une concentration de 20% de NaCl). Certaines espèces du genre *Staphylococcus* sont capables de vivre dans des environnements hostiles **(Pellerin JL et *al*, 2010).**

 En bouillon :

S. aureus donne un trouble uniforme en quelques heures.

 Sur gélose ordinaire :

Les colonies sont lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, de 1 mm de diamètre. Elles se pigmentent habituellement en jaune doré (aureus), parfois en jaune citron, et parfois sont non pigmentées.

 En gélose profonde :

S. aureus pousse dans la zone d'aérobiose et dans la zone d'anaérobiose. C'est donc une bactérie aérobie-anaérobie facultative, capable de se multiplier à la surface de la peau, en aérobiose et dans les tissus mal oxygénés, plaie profonde.

6.3. Caractères biochimiques

Toutes les souches de *S. aureus* ont un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif, produisent une catalase et une nucléase thermostable mais pas d'oxydase. Ainsi ces souches sont : indole +, acétone+, uréase+, VP+, RM+, réduisant le tellurate de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine. S. aureus est capable de dégrader de nombreux substrats glucidiques, protéiques et lipidiques grâce à son équipement enzymatique. La plupart des sucres sont fermenté (glucose, saccharose, lactose, et Mannitol) (**Fiche technique bactériologie. 1973)**

7. Facteurs de virulence :

Les facteurs de virulence identifiés sont nombreux chez les Staphylocoques. Ils sont codés par des gènes localisés sur le chromosome ou sur les éléments génétiques mobiles**(Figure 2)(Fomba, 2006**) Ces facteurs codent pour des protéines de surface ou des exo-protéines et permettent à la bactérie de combattre le système immunitaire, d'adhérer aux cellules, de se disséminer dans le corps mais aussi d'utiliser les nutriments et l'énergie disponible**(Chevalier, C., 2009)** .Les Staphylocoques ont aussi des facultés d'adhésion aux structures inertes (corps étrangers, prothèses) et de production d'un biofilm qui est le principal facteur de virulence de ces bactéries **(Al Alam, D., 2008)**

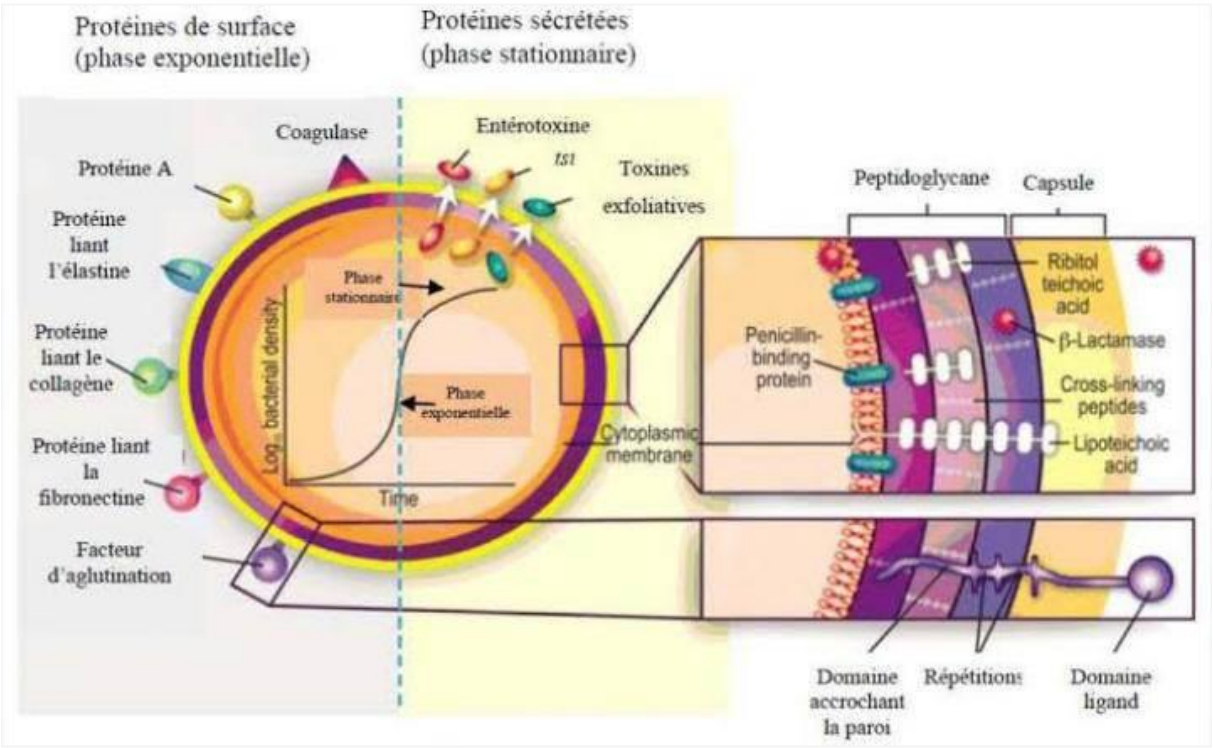


Figure 2 : Facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus*

7.1. Toxines:

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

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

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

7.1.2. Les entérotoxines (A, B, C, D, E et F) : Neurotoxines avec une activité super antigène Sur les lymphocytes T : vomissements, diarrhée, choc

7.1.3. Exfoliatines : Sont en nombre de trois A, B et C. Ce sont des toxines épidérmolytiques impliqués dans l'epidrmolyse bulleuse Staphylococcique **(Bailey et *al,* 1995)**. Il existe trois types d'exfoliatines : l'exfoliatine A (ETA) codée par le gène eta, l'exfoliatine B (ETB) codée par le gène etb et l'exfoliatine D (ETD) codée par le gène etd. Elles clivent la desmogléine-1 reliant les cellules granuleuses de l'épiderme, ce qui induit l'apparition d'un décollement intra-épidermique spécifique **(Ladhani, 2003).**

7.2. Les hémolysines (alpha, bêta, delta, gamma) :

-La lyse des globules rouges.

-La toxine alpha a un rôle possible dans l'évasion du phagosome intracellulaire.

-L'évasion du phagosome intracellulaire.

7.3. Exo enzymes:

7.3.1. La protéase: L'hydrolyse des protéines

7.3.2. Lipase et les phospholipases : L'activité enzymatique sur les lipides et les phospholipides.

7.3.3. Hyaluronidase: Facteur de diffusion, l'hydrolyse de la matrice extracellulaire

7.3.4. Le coagulase libre (protéine extracellulaire): L'adhérence à la prothrombine, transforme le fibrinogène en fibrine.

8. Les adhésions:

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

Les MSCRAMMs constituent une famille de plus de 20 membres qui reconnaissent les composants de la matrice extracellulaire (ECM). Les SERAMs forment un groupe de 5 adhésines, y compris, la protéine A liant le fibrinogène, la coagulasse, protéine liant le fibrinogène extracellulaire, la protéine liant l'ECM et la protéine d'adhérence extracellulaire (Eap) **(Chavakis, T et *al,* 2005)**

8.1. Protéine A ou Spa :

La protéine A des staphylocoques est une protéine ancrée à la paroi de la bactérie qui à initialement été décrite chez *Staphylococcus aureus*. Cette protéine de 42kDa contient 5 domaines extracellulaires (A à E) très homologues qui ont la capacité de fixer certains types d'anticorps comme les immunoglobulines G (IgG) par leur extrémité Fc et empêchant ainsi l'interaction du complément avec les IgG fixées **(Lowy, F. D. 1998) ;(Chambeaud, F. 2012)** ainsi que la région VH3 du site de fixation de l'antigène (fragment Fab) des immunoglobulines de classe M **(Graille, M et *al,* 2000)**

9. Quelque pathologies causées par *Staphylococcus aureus chez l'animale:*

Les *Staphylocoques* sont des pathogènes majeurs chez les animaux. Les espèces *S.aureus* sont d'une importance particulière dans les infections animales **(Götz, F et *al,* 2006).**

9.1. Chez l'animal :

S.aureus est un pathogènes majeurs chez les animaux, et d'une importance particulière dans les infections animales **(Götz, F et *al,* 2006).** *S.aureus* est responsable des : Infections pulmonaires : Embolie et Aspiration, Infections cutané et des tissus mous : Furoncles, abcès, Infections des plaies (traumatiques, chirurgicales), Cellulite et Impétigo (aussi causé par les Streptocoques), Bactériémies (souvent avec des abcès métastatiques), Endocardites, Infection du système nerveux central : Abcès du cerveau, Méningite-rare, Abcès épidural, Muscles et squelette : Ostéomyélite, Arthrite, Tractus génito-urinaire : Abcès rénal, Infection du tractus urinaire inférieur, Maladies provoquées par des toxines : Syndrome du choc toxique, Intoxications alimentaires (gastroentérites) **(Schaechter M et *al*., 1999).**

9.1.1. Chez les bovins :

Staphylococcus aureus est une bactérie qu'on retrouve à la surface de la peau de la mamelle et des trayons. En cas de contamination de la mamelle, on peut également la retrouver dans le parenchyme. En effet, cette bactérie se transmet principalement pendant la traite par l'intermédiaire du manchon trayeur, de remontées de lait ou par l'intermédiaire des mains du trayeur (principalement par des mains crevassées) **(Rémy, D., 2010).**

Ce germe est connu pour sa forte contagiosité, et résistance dans le milieu extérieur.

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

9.1.2. Chez les petits ruminants :

Chez les petits ruminants, *S. aureus* est une cause majeure de mammite et de septicémie, par des infections pouvant avoir une origine thromboembolique. Ces infections peuvent également être secondaires à une infestation parasitaire, qui permet à S. aureus de la flore cutanée normale de pénétrer dans la circulation sanguine et chez les agneaux peut entraîner une toxémie mortelle ou une maladie chronique avec dissémination organique et formation d'abcès. Chez les caprins, l'infection staphylococcique peut être secondaire à une infection par le virus de la parapox, entraînant une gale chorioptique ou une dermatite pustuleuse contagieuse **(Andreas F. Haag et *al*, 2019).**

9.1.3. *S.aureus* chez les lapins :

L'infection staphylococcique entraîne des pertes économiques substantielles dans la cuniculture commerciale et des signes cliniques d'infection à *S. aureus* sont présents dans plus de 60% des élevages de lapins. L'infection des lapins par *S. aureus* est associée à une dermatite suppurée, des abcès, une pododermatite et une mammite **(Andreas F. Haag et *al* ,2019)**

9.1.4. *S. aureus* dans les poulets et autres volailles :

La croissance de l'aviculture commerciale a fourni un terrain fertile pour les infections staphylococciques et le transfert zoonotique, aureus est l'une des principales causes d'infections bactériennes chez les volailles, provoquant un large éventail de maladies,

notamment l'arthrite septique, les abcès sous-cutanés, la dermatite gangreneuse et la septicémie **(Andreas F. Haag et *al,* 2019)**

9.1.5. Animaux de compagnie :

S.aureus provoques chez les chats et les chien des dermatites cutanée, des abcès, et des cystites, des métrites chez la chienne (**Vincent Peton, Yves Le Loir, 2013**).

S. aureus associé aux animaux domestiques **(Weese et al.2006 ; Zhang et al. 2011**), et les animaux domestiques tels que les chiens et les chats peuvent servir de réservoir de *S. aureus*. Ces espèces sont des organismes commensaux, mais elles sont également à l'origine de maladies (telles que la pyodermite et l'otite externe) chez les chiens et les chats **(Devriese LA et al.2005 ; Morris DO et *al*. 2006)**.

9.1.6. Chez le cheval :

Des infections à SARM de la peau et des tissus mous, des bactériémies, des arthrites septiques, des ostéomyélites, des infections liées aux implants, des métrites, des omphalites, des infections liées aux cathéters et des pneumonies ont toutes été signalées chez les chevaux **(Morgan M. 2008)**.

9.1.7. Les Mammites *satphylococcique* :

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

En présence d'infection à *Staphylococcus aureus*, l'augmentation du nombre de quartiers infectés dans l'élevage est rapide, mais il faut tout de même savoir que, dans de plus rares cas, les infections à *Staphylococcus* aureus sont peu contagieuses **(Sommerhäuser et *al,* 2003)**, *Staphylococcus aureus* à le pouvoir de pénétrer profondément dans la mamelle grâce à un équipement enzymatique performant, il peut alors s'enkyster dans le tissu mammaire. Cette bactérie a la capacité de se mettre à l'abri dans des micro-abcès et dans les cellules **(Rémy, D., 2010).** Ces propriétés lui permettent de résister aux attaques du système immunitaire et de s'isoler derrière la paroi des abcès qui empêche la pénétration des antibiotiques **(DESCOTEAUX, L. 2004).**Ce germe est ainsi assez résistant aux traitements. Les rechutes sont donc fréquentes. Ainsi, la réussite d'un traitement dépend de sa durée, de la réalisation

d'un traitement ou non par voie générale, de l'âge de l'animal, des mesures d'hygiène prises pour réaliser le traitement local et du moment du traitement. L'efficacité du traitement en lactation est faible, elle est meilleure au tarissement. Ce faible taux de réussite du traitement est souvent à l'origine d'une réforme des animaux **(Hanzen, C., 2009).**

10. Le biofilm chez *Staphylococcus aureus :*

Les biofilms sont des communautés bactériennes attachées à une surface biotique ou abiotique produisant une matrice extracellulaire où les cellules bactériennes présentent certains caractères phénotypiques différents des cellules n'étant pas adhérées à une surface **(Lister, J. L et *al,* 2014)** et qui possède un groupe de gènes code pour la production d'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA). Cela favorise l'adhérence intercellulaire des bactéries et l'accumulation de biofilm multicouches **(Gillespie et *al*, 2006)**

Le biofilm joue un rôle très important dans la physiopathologie de certaines infections staphylococciques notamment dans la résistance aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte **(Guillaume, V. 2014).**

La formation d'un biofilm de *Staphylococcus* est un processus qui se déroule en deux phases. La première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface, et la seconde à la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche des cellules bactériennes. Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme **(Otto, M. 2008).**

Chapitre II

Les biofilms

1. Qu'est-ce qu'un biofilm ?

Un biofilm peut être défini comme un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes **(Behlou et *al,* 2008) ;** qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de micro colonies associées entre elles et à des surfaces biotiques ou abiotiques qui peuvent prendre plusieurs formes : minérales (roche, interface air-liquide...), organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surface alimentaires ou coques des navires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) **(Branger et all., 2007) ;((Bellifa, S. 2014)**

2. Les Etapes de la formation d'un biofilm:

2.1. Adhésion réversible:

Cette étape implique des phénomènes physico-chimiques non spécifiques, qui se produisent Quelques minutes après avoir exposé une surface solide propre à un liquide contenant du liquide micro-organisme. Ce dernier déplacement est le résultat de multiples phénomènes Chimie Physique ou Biologie :

¬ Mouvement brownien ou transport par diffusion.

¬La sédimentation, qui est liée à la différence de gravité entre les cellules bactériennes et les bactéries le liquide dans lequel il se trouve.

¬Transport convectif, du fait des propriétés hydrodynamiques du fluide, c'est un état La turbulence favorise l'adhérence en augmentant la probabilité La rencontre entre une cellule bactérienne et une surface

¬Chimio-taxie, le mouvement d'un groupe de flagelles

(Davey ME et all., 2000)

On dit qu'il s'agit d'une "adhésion réversible" car les cellules s'attachent à Surface pendant un certain temps mais peut se décoller. Le processus d'adhésion La contamination microbienne des surfaces dépend de nombreux facteurs, notamment :

¬Types de bactéries.

¬Composition de la surface cellulaire.

¬ La nature de la surface.

¬Disponibilité des nutriments

(Bezoui M. (2016)

2.2. Adhésion irréversible :

Deuxièmement, l'adhérence irréversible implique un phénomène Organisme qui constitue une étape particulière. La fixation devient irréversible en raison de Les bactéries produisent des exopolysaccharides (EPS), en particulier Adhérence variable selon les espèces bactériennes **(Høiby N et al, 2011).**

2.3. Formation de micro-colonies:

Une fois les bactéries adhèrent d'une manière irréversible à une surface et s'agrègent entres elles, ces microorganismes vont se multiplier lentement et produire encore des EPS afin de former des micro-colonies. Ces derniers vont recouvrir toute ou une partie de la surface **(Jacobsen S M et al, 2008).**

2.4. Accumulation des microcolonies:

Les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'exopolysaccharide (EPS) et être utilisé par les bactéries **(Filloux A, Vallet I , 2003)** ; La formation des agrégats de microcolonies générer des interactions significatives tel que l'échange de substrats, produits, inhibiteurs, déploiement de molécules de signaux entre eux. La densité cellulaire, la taille et la géométrie de l'agrégat et son activité métabolique conduisent à des barrières de diffusion, qui peuvent être minimales ou suffisamment provoquer des changements importants dans sa biologie. Le plus souvent, en raison de sa faible solubilité dans eau et taux élevé d'utilisation par les bactéries, un fort gradient de tension en oxygène se développe ce qui peut conduire à des régions anoxiques et à la prolifération d'espèces anaérobies **(Allison D. G et al, 2000).**

2.5. Maturation du biofilm:

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation des canaux aqueux et des pores entre le micro colonies, permettant l'acheminement d'oxygène et des nutriments nécessaires À la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (Filloux À**, Vallet I, 2003).** Un biofilm est constitué de 85 % de matrice extracellulaire et de 15 % de microorganismes **(Behlou I, Gilmore M.S, 2008**).La matrice extracellulaire (MEC) est principalement constituée 97 % d'eau. Autres substances souvent présentes dans la matrice du biofilm comprennent l'ADN, l'ARN, les protéines et les enzymes atteignant des niveaux d'environ 2 % au total **(Sutherland I.W. 2001)**

2.6. Détachement et dispersion du biofilm :

Pendant la dispersion; la dernière étape de cycle de vie du biofilm. Des cellules individuelles sortent du biofilm pour reprendre un mode de vie planctonique**. (Rumbaugh, K. P., ETSauer, K, 2020).**

Les cellules bactériennes détachées du biofilm reviennent à l'état planctonique et peuvent rattacher aux zones vierges et initier un nouveau cycle de formation de biofilm. La carence nutritionnelle est le facteur déclencheur du phénomène poussant les bactéries à trouver un milieu plus favorable **(O'Toole G.A et al, 2000)**

Le détachement s'effectue selon deux modes :

Passivement via l'action du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve selon trois modes :

*Erosion : détachement continue de cellules individuelles ou de petits agrégats.

*Relargage : détachement massif et rapides d'une quantité importante de bactérie.

*Abrasion : détachement par collision de particules

*Ou bien activement initiée par les bactéries elles-mêmes afin de coloniser de nouvelles surfaces. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas. La libération active se fait en réponse à quelques conditions environnementales comme l'accumulation de déchets, la carence en quelques besoins nutritifs ou bien la limitation de surfaces **(Bezoui M. 2016).**

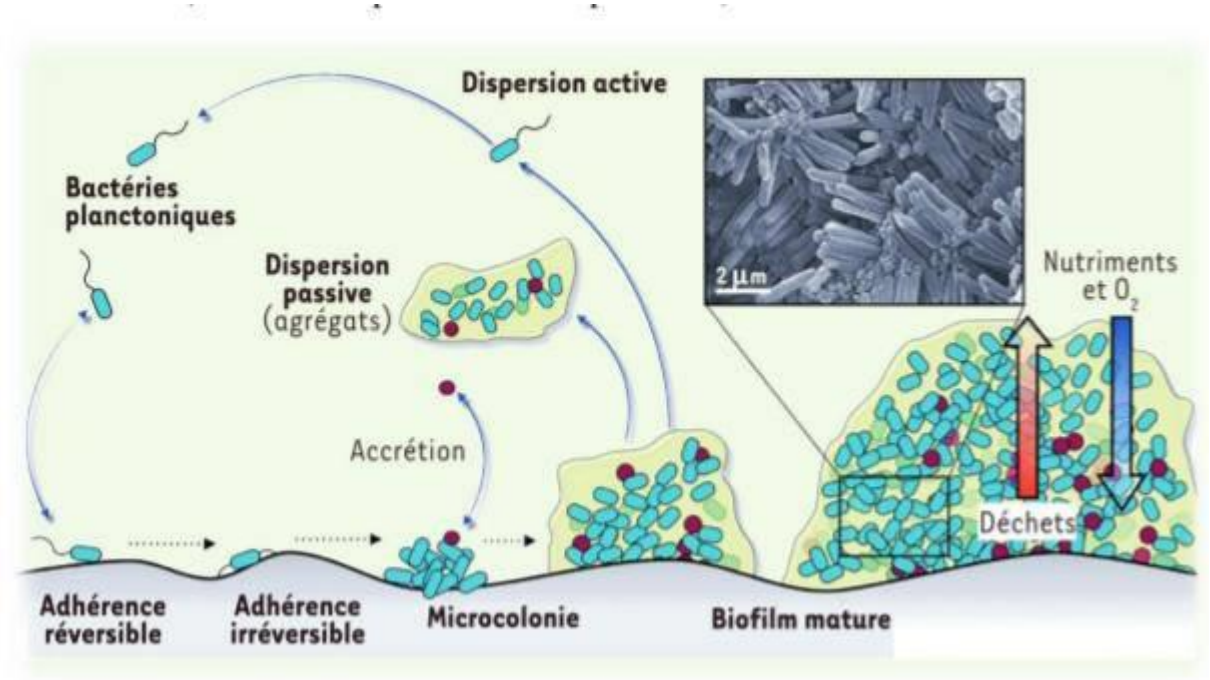


Figure 3:Développement d'un biofilm bactérienne **(Lebeaux D, Ghigo J.M (2012)**

3. Régulation de la formation d'un biofilm:

Le quorum sensing joue un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms car au sein d'un biofilm, les microorganismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules **(Tomlin and Mallot, 2005)**.

3.1.Le quorum sensing :

Le Quorum Sensing (QS) est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées « auto-inducteurs » qui sont produites en phase de croissance bactérienne. Lorsque la concentration des auto-inducteurs atteint un seuil critique dans le milieu, ceux-ci pénètrent dans la cellule et interagissent avec un régulateur transcriptionnel qui permet l'expression de gènes spécifiques en réponse à la forte Concentration de cet auto-inducteur **(Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; DjelloulDaouadji, 2010ecastaings, 2010)**.

3.1.1 Les molécules impliquées dans le quorum sensing :

Le système QS est rencontré à la fois chez les bactéries à Gram négatif et positif. Chez les bactéries à Gram négatif, il implique la sécrétion de petites molécules dérivées d'acides gras. En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL). Alors que chez les bactéries à Gram positif, il est basé sur la production de dérivés peptidiques dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés) **(Irie and Parsek, 2008)**.

Un dernier type de molécules a été mis en évidence par (**Bassleret al.,1994)**, mais sa structure n'a été connue qu'en 2001, il s'agit d'une furanone (ou AI-2) qui permettrait une Communication inter-espèces, contrairement aux deux autres qui se limitent à l'intra-espèces. **(Schauder*et al.*, 2001 ; Irie and Parsek, 2008)**.

3.1.2 Rôle du quorum sensing:

Le QS régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population et aussi en déterminant l'épaisseur de ce dernier. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères ou certains facteurs de virulence extracellulaires. Les molécules du QS jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires et aussi dans l'établissement d'antibiorésistance **(Queck*et al.*, 2006)**.

4. Structure et composition du biofilm:

Les composants de base des biofilms sont les micro-organismes agrégés et la matrice qu'ils synthétisent. Les microbes ne représentent que 2 % à 15 % de la biomasse du biofilm, tandis

que le substrat représente 50 % à 90 % de la masse organique du biofilm **(Costerton J W., Dolan R M. (2002)).**

4.1.Les microorganismes :

Seuls quelques biofilms sont constitués d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est lié au milieu environnant plutôt qu'à la nature du microbe. C'est le cas des biofilms naturels, qui sont généralement composés de nombreux types de micro-organismes : bactéries, protozoaires, algues, champignons, chaque groupe exerçant des fonctions métaboliques spécialisées (**Branger et al, 2007)**

4.2. La matrice :

Il est très hydraté, son eau peut constituer 97% du poids humide du biofilm **(Roux A., Ghigo J-M. (2006)** .Il peut être composé de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations (**FLEMMING et WINGENDER, 2010)** La composition du substrat varie selon les espèces bactériennes et les conditions de croissance **(Yannick D N et al, 2014).**

4.3. L'organisation :

Le réseau de canaux d'eau dans le biofilm permet à l'oxygène et aux nutriments d'être transportés entre les microcolonies vers des zones plus profondes, et permet également l'élimination des déchets produits par ces organismes**. (Nadji, Mizou, 2015)**Un biofilm n'est pas un milieu homogène car il comporte des régions à teneur variable en oxygène ou en nutriments. Les agrégats microbiens au centre du biofilm sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, tandis que les agrégats microbiens à proximité des canaux sont mieux oxygénés et riches en nutriments **(Roux A et al, 2006)** ; Il existe plusieurs niveaux d'hétérogénéité des biofilms, car tous les biofilms n'ont pas la même épaisseur :

* Hétérogénéité géométrique : épaisseur du biofilm, rugosité et porosité de surface, surface du substrat recouverte de biofilm microbien.

*Hétérogénéité chimique : diversité chimique des solutés (nutriments, métabolites, inhibiteurs, etc.), variation du pH, diversité des réactions (aérobie/anaérobie, etc.).

*Hétérogénéité biologique : diversité des espèces microbiennes et leur répartition spatiale, différences d'activité (prolifération cellulaire, production de polymères extracellulaires, mort cellulaire, etc.) (**Bezoui M. (2016)**

5. Avantages et conséquences du mode de vie en biofilm:

5.1. Coopérations métaboliques et échanges d'informations au sein du biofilm:

5.1.1. Coopération métabolique :

Des études ont montré que la formation de biofilm dépend de la disponibilité des nutriments pour les bactéries, car dans des conditions pauvres en nutriments, les bactéries resteront planctoniques afin de se déplacer vers un environnement plus favorable **(Stanley et all., 2004).** Les biofilms, comprenant généralement plusieurs souches bactériennes, favorisent les relations mutualistes entre les bactéries ayant des besoins métaboliques uniques. Leur proximité favorise les échanges et facilite l'établissement de liens symbiotiques.(**Shapiro, J.A. 1998)**

5.1.2. Signalisation au sein du biofilm:

Le quorum sensing est le mécanisme qui permet la communication intercellulaire à travers la densité bactérienne et leurs contacts cellulaires**(Ahmer, B.M.M. 2004)**.Chez les bactéries Gram-négatives, l'auto inducteur est un dérivé N-acylhomosérine lactone ; Alors que chez les bactéries Gram-positives, ce sont des polypeptides**(Waters et *al,* 2005)**Un troisième mécanisme, appelé AI-2, serait un système de signalisation partagé par toutes les bactéries **(Winans S et *al,* 2002)**La détection du quorum est impliquée dans la régulation des différentes étapes du développement du biofilm. Cette stratégie de communication prévient le surpeuplement inutile et contrôle la concurrence pour les nutriments, en plus d'influencer le processus d'infection, en particulier la dissémination et la création de nouveaux sites d'infection **(Hornby et all., 2001)** Il peut également inhiber ou stimuler l'expression de certains propriétés comme la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaire comme les protéases. (**Irie et all., 2008)**

5.2. Transfert d'information génétique au sein du biofilm:

Le transfert latéral de l'information génétique joue un rôle important dans l'évolution et la diversité génétique des communautés microbiennes. L'un des principaux mécanismes de transfert de gènes est la conjugaison, qui permet l'échangedirect d'ADN en établissant un contact physique entre deux cellules en reliant les piles **(Bjorklof et all., 2000)**

5.3. Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement:

Les propriétés particulières de la structure du biofilm et les propriétés physiologiques des micro-organismes résidant dans le biofilm confèrent une forte résistance aux diverses agressions extérieures, telles que les rayons UV, les changements de pH et de pression osmotique, la prédation et les agents antimicrobiens. La sensibilité réduite aux antibiotiques n'était pas associée à un seul mécanisme de résistance **(Ross, J.F. 2010).** Trois hypothèses principales ont été proposées pour expliquer Mécanismes de résistance du biofilm aux antibiotiques **(Stewart et *al.,* 2001)**

La deuxième hypothèse porte sur l'environnement spécifique du biofilm, dont la partie la plus profonde est riche en résidus acides et privée d'oxygène et de nutriments, gênant l'action des antibiotiques. **(Stewart et *al,* 2001)** .Enfin, la dernière hypothèse repose sur l'altération des propriétés physiologiques des micro-organismes en induisant des mécanismes de résistance connus, dus à la structure de biofilms facilitant le transfert horizontal de gènes entre bactéries, processus d'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques **(Roux et *al,* 2006)**

6. Facteur favorisant la formation de biofilm:

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

6.1. Types de surface:

La surface d'adhésion des organismes sessiles peut être abiotique (les matériaux inertes) ou biotique (les tissus ou cellules vivantes). Pratiquement n'importe quelle surface (animale, minérale, ou végétale) est capable d'être le siège d'une colonisation bactérienne avec formation d'un biofilm, y compris les coques des bateaux, les canalisations d'eau, de pétrole, les rochers dans les rivières, les lentilles de contact, et toutes les variétés d'implants biomédicaux (**Characklis WG et *al,* 1990)**

6.2. La rugosité de la surface:

La surface solide peut avoir plusieurs caractéristiques qui sont importantes dans le processus de fixation ont noté que l'étendue de la colonisation microbienne semble augmenter à mesure que la rugosité de la surface augmente. En effet, les forces de cisaillement sont diminuées et la surface est plus élevée sur les surfaces plus rugueuses (**Characklis WG et *al,* 1990)**

6.3. Les propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent également exercer une forte influence sur le taux et l'étendue de la fixation. La plupart des chercheurs ont découvert que les micro-organismes se fixent plus rapidement aux surfaces hydrophobes et non polaires telles que le téflon et d'autres plastiques qu'aux matériaux hydrophiles tels que le verre ou les métaux de la surface peuvent également exercer une forte influence sur le taux et l'étendue de la fixation. La plupart des chercheurs ont découvert que les micro-organismes se fixent plus rapidement aux surfaces hydrophobes et non polaires telles que le téflon et d'autres plastiques qu'aux matériaux hydrophiles tels que le verre ou les métaux **(Fletcher M et *al,* 1979)**

6.4. Présence de films protéiques sur la surface:

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques des surfaces, 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 respiratoire influence l'attachement des bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms **(Mittelman, M.W., 1996)** L'attachement à une matrice protéique est la première étape de formation d'un biofilm dans le corps humain **(Otto, M. 2008)**.Par exemple, Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis expriment à leur surface des molécules, les MSCRAMM, capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine. Ces interactions spécifiques entre matrice protéique de l'hôte et MSCRAMM sont très importantes pour l'établissement de la colonisation bactérienne (**Patti et *al,* 1994)**

6.5. Caractéristiques du milieu:

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

6.5.1. Température:

L'augmentation de la température favorise la multiplication bactérienne. Les températures élevées pendant la croissance initiale du biofilm accélèrent non seulement le processus de formation du biofilm, mais influencent également les performances bioélectrocatalytiques de ces biofilms lorsqu'elles sont mesurées à des températures de fonctionnement identiques. (**Tremblay YD et *al,* 2014)**

6.5.2. pH :

Conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité **(Martinez et *al,* 2007),** Le pH de milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposé selon leur pKa **(Boutaleb, N., 2007).**

6.5.3. Sources de carbone disponibles :

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

6.5.4. Concentrations en nutriments:

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

6.5.5. Concentrations en certain cation:

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

6.5.6. Forces hydrodynamiques:

Les forces hydrodynamiques sont considérées comme étant les facteurs environnementaux les plus susceptibles d'affecter l'adhésion bactérienne et le développement du biofilm bactérien (**Baillif et *al,* 2010)** Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide **(Donlan et *al,* 2002)**

7. Biofilm chez *S. aureus* :

La formation de biofilm par des bactéries pathogènes joue un rôle important dans le développement d'infections associées à un biofilm, et Staphylococcus aureus est l'un des agents pathogènes les plus courants provoquant des infections nosocomiales associées à la formation de biofilm.

La formation de biofilms bactériens implique plusieurs étapes, notamment l'attachement, la prolifération et le détachement après l'infection. La fixation initiale se produit très probablement par la liaison de protéines de surface bactériennes ou de récepteurs à des protéines de la matrice hôte telles que le fibrinogène, la fibronectine et la vitronectine. Pendant la phase proliférative, les cellules forment des biofilms

S'intègre dans une matrice extracellulaire protectrice composée principalement de polysaccharides extracellulaires (PIA), d'acide teichoïque, de protéines et d'adhérences intercellulaires d'ADN. Les composants de la matrice forment une barrière qui empêche les bactéries d'être tuées par les antibiotiques ou éliminées par les mécanismes de défense de l'hôte **(Ying Liu et *al,* 2020).**

Le processus par lequel les cellules staphylococciques se détachent du corps du biofilm reste insaisissable, malgré certaines preuves de production complexe Les delta toxines aliphatiques peuvent être impliquées dans la libération des cellules staphylococciques des biofilms.

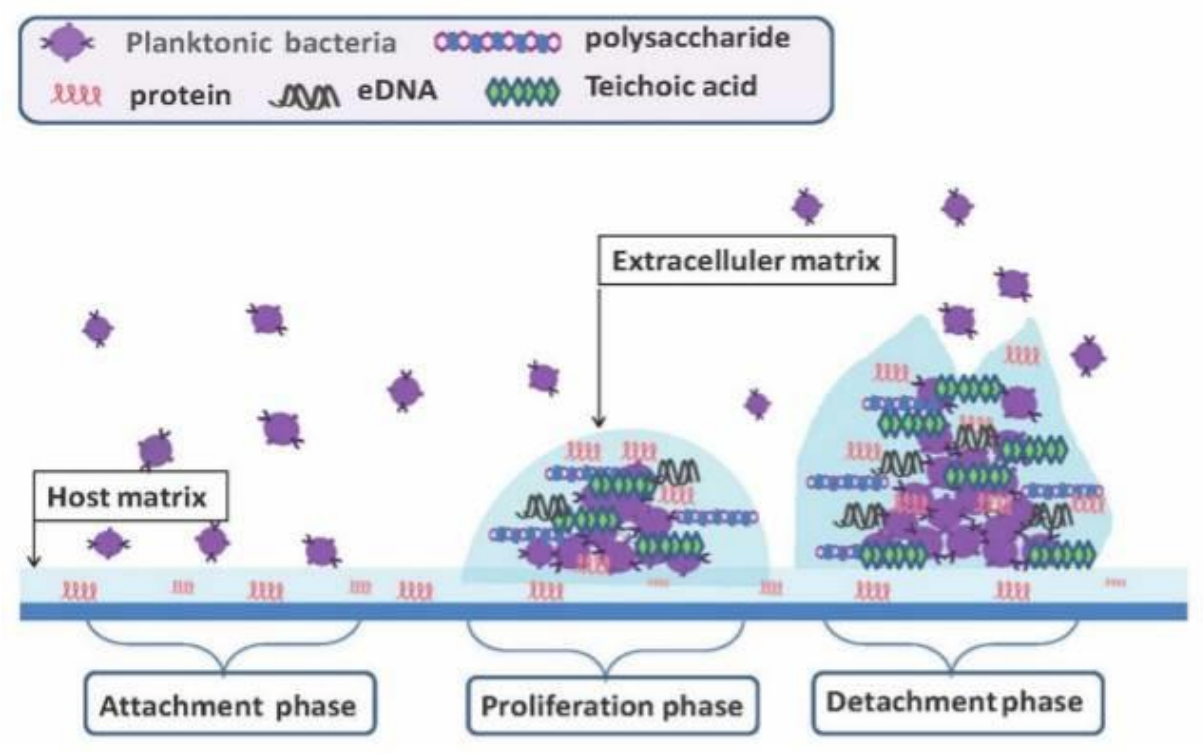


Figure 3: Représentation schématique de la formation de biofilm lors de l'infection.

S. aureus a développé une série de régulateurs de signal à deux composants qui permettent à la bactérie de détecter son environnement immédiat et de moduler les réponses cellulaires bactériennes et la expression des gènes de virulence. Dans de nombreux cas, les régulateurs de réponse modulent l'expression du gène cible directement en tant qu'activateur et/ou répresseur transcriptionnel. *S. aureus* est capable de se protéger en réponse à des conditions de stress en passant à des modes de vie alternatifs, comme dans un biofilm..**(Cramton SE,Ulrich M, et *al*,2001)**

7.1. Effet des conditions environnementales sur la formation de biofilm *S. aureus* :

Il a été démontré que plusieurs facteurs environnementaux affectent la capacité de S.aureus à former un biofilm comme suit :

7.1.1Composition de milieu de culture :

Différents phénotypes de formation de biofilm peuvent être observés dans différents milieux. Les biofilms ont été comparés à un bouillon trypsique de soja (TSB) additionné de 2 % de

glucose (TSB glu) et d'une infusion cœur-cervelle (BHI). 15 Cependant, Singh et ses collègues ont montré que le bouillon BHI était plus efficace que le TSB pour la formation de biofilm.**(Singh AK, et *al,* 2017)**La supplémentation en glucose, saccharose et chlorure de sodium augmentait considérablement le biofilm Arce Miranda et ses collègues ont découvert que, dans des conditions aérobies, la formation de biofilm de thioglycolate de Staphylococcus aureus dans le milieu de culture était renforcée avec l'oxygène réactif espèces (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO). Cela suggère que les ROS, les intermédiaires azotés réactifs (RNI) et leurs dérivés en aval peuvent affecter le développement du biofilm. (**Arce Miranda JE, Soto et *al,* 2011)** Il a été suggéré que la formation de biofilm peut induire un stress cellulaire, qui à son tour affecte la croissance bactérienne dans différentes conditions et produit des ROS et des RNI, réduisant ainsi la matrice extracellulaire dans des conditions défavorables. Les ions dans le milieu peuvent affecter la formation de biofilm de Staphylococcus aureus car les cellules de Staphylococcus présentent une hydrophobicité modérée. La capacité de S. aureus à adhérer initialement au polystyrène a été rapportée comme étant liée à la force ionique du milieu. ***(*Vazquez-Sanchez D, Habimana O et *al.* 2013)**

7.1.2 Pression osmotique :

Les changements de pression osmotique dans le milieu peuvent affecter la capacité de S. aureus à former des biofilms. Ce phénomène a été associé à des changements dans l'expression de gènes qui aident à réguler la formation de biofilm, notamment icaA, sarA, rbf et sigma B. **(Cramton SE, Gerke C et *al*. 1999)** L'ajout de NaCl a amélioré l'agrégation et la formation de biofilm.

7.1.3. Acidité et alcalinité du milieu de culture:

La formation de biofilm nécessite un niveau d'acidité approprié dans le milieu de culture bactérienne. Ni conditions très acides (pH 3) ni conditions fortement alcalines (pH 12) (**Khalil MA, et al, 2014)**, Le pH acide favorise la formation de biofilm par rapport au pH alcalin, produit par Staphylococcus aureus Les biofilms sont plus stables au pH physiologique.

7.1.4 Autres facteurs :

L'alcool est un autre facteur qui peut favoriser la formation de biofilm de S. aureus. La formation de biofilm renforcée par l'alcool peut être due à son induction de l'expression d'icaA et d'icaD (**Luther MK et *al,* 2011).** Certains autres facteurs qui affectent la formation de biofilm bactérien comprennent la température et la durée d'incubation. **(Arce Miranda JE et *al.* 2011)**

Chapitre III

L’auto-aggrégattion

1. Définition :

Les bactéries se trouvent souvent en consortiums, attachées à des surfaces, des cellules non bactériennes ou d'autres bactéries. L'adhésion bactérie à bactérie de souches génétiquement identiques est appelée auto-agrégation, tandis que l'adhésion inter-souches de souches génétiquement différentes de la même espèce ou d'espèces différentes est appelée co-agrégation. Bien que nous reconnaissions que les mécanismes et les facteurs d'influence de l'auto-agrégation et de la co-agrégation se chevauchent, cette revue se concentrera principalement sur l'auto-agrégation, qui peut être moins courante dans la nature mais est mieux comprise d'un point de vue microbiologique. Une excellente revue sur l'auto-agrégation L'agrégation se produit en raison d'interactions chimiques ou électrostatiques entre les molécules de surface cellulaire, qui peuvent s'auto-associer ou se lier à différents récepteurs. **(El-shama Q. et *al,* 2021)**

2. Effecteurs d'auto-agrégation :

2.1. Fimbriae:

Les pilis, ou pili, sont des organites structuraux qui remplissent une gamme de fonctions dans les bactéries, dont beaucoup sont adhésives. Ces pilis rétractables médient généralement l'adhésion de la cellule hôte par la liaison des protéines de pointe de pili à des récepteurs spécifiques et l'agrégation par des interactions latérales entre les principales sous-unités structurelles de différents pili **(Kennouche , et *al,* 2019)**, Ces adhésines bifonctionnelles jouent un rôle important dans l'initiation, la croissance, le maintien et la dégradation des auto-agrégats (microcolonies) dans la niche d'infection.

2.2. Macromolécules sécrétées:

L'auto-agrégation peut être une conséquence indirecte de facteurs sécrétés médiant indirectement l'agrégation en se liant à d'autres facteurs de surface **(Li, D, Liang, et *al* 2020).**

Le traitement à la protéinase K altère ou abolit l'auto-agrégation plus souvent que le periodate de sodium (pour éliminer les polysaccharides) et la DNase1 (pour éliminer l'ADN extracellulaire).

Cependant, les polysaccharides et l'ADN extracellulaire libérés lors de l'autolyse peuvent favoriser l'auto-agrégation. Le myrténol, un dérivé végétal bioactif inhibiteur de l'autolyse, réduit considérablement la capacité d'auto-agrégation du Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline. **(Selvaraj, et *al* 2019).**

3. Modulation de l'auto-agrégation:

La régulation peut être transcriptionnelle, post transcriptionnelle, voire résulter d'interactions entre différents facteurs de surface **(Blanton , V et *al*, 2018)** . Les adhésines, en particulier les plus courtes telles que les protéines de membrane externe intactes et les auto-transporteurs, peuvent être masquées ou protégées par des exopolysaccharides (EPS), des pili et même des protéines sécrétoires(**Bhargava . et all., 2009)** L'interférence de la capsule peut être due à sa charge électrostatique négative ou à son encombrement stérique dû à des facteurs d'auto agrégation. Ainsi, l'auto-agrégation est le produit d'une orchestration complexe de facteurs de surface qui garantit que les facteurs d'auto-agrégation sont masqués et démasqués si nécessaire ; et qu'elle est soigneusement régulée à la fois transcriptionnellement et post-transcriptionnellement.

4. Mettre à nu la confusion : les phénotypes associés à l'auto-agrégation:

La formation de biofilm est une séquelle courante de l'agrégation (**Sorroche, GF, et *al*, 2012**), mais les phénotypes sont séparables. Dans les cas où des agrégats - ou même des biofilms - se détachent ou flottent, la relation entre l'auto-agrégation et la qualité du biofilm peut ne pas être observable dans les tests de laboratoire traditionnels, qui mesurent les biofilms sur des supports solides horizontaux, mais peut être plus visible sur des surfaces montées verticalement (**BlantonL, V, et *al* 2018).**

Les biofilms sur les surfaces horizontales bénéficient de l'attraction gravitationnelle des cellules planctoniques et des agrégats de biofilm, tandis que l'auto-agrégation est moins importante pour la formation de biofilm médée par la contrainte de cisaillement dans les systèmes à flux continu **(Furuichi, Y. et *al*, 2018)**.

La motilité est un facteur important pour la formation de biofilm, alors que l'auto-agrégation ne l'est pas. Dans plusieurs études, une diminution de l'hydrophobicité a augmenté l'auto-agrégation **(Zhang, et *al*, 2020)**, mais a diminué la charge cellulaire, l'adhérence la masse du biofilm.

Au total, de nombreux phénotypes sont associés à l'auto-agrégation. Lors des tests, l'auto-agrégation ou les mesures indirectes doivent être vérifiées au microscope, mais surtout par des tests de sédimentation pour éviter toute confusion (**El-shama Q. A. Nwoko, Iruka et *al* 2021).**

5. Bénéfices évolutifs de l'auto-agrégation aux bactéries :

5.1. Colonisation de niche/hôte:

L'autoagrégation peut être importante pour l'entrée, l'établissement et le maintien d'une niche dans la colonisation de l'hôte et la pathogenèse de la maladie

5.2. Reconnaissance de la parenté :

Les souches coagrégées s'agrègent préférentiellement avec d'autres souches présentant des adhésines de surface identiques ou similaires. Similitudes et différences entre les adhésines, ou les allèles de la même adhésine, en tant qu'indices discriminants pour les interactions parentales/automatiques préférentielles (autoagrégation) ou les interactions mixtes (coagrégation) entre les souches **(Adam, et *al,* 2019)**

5.3. Survivre au stress environnemental :

L'auto-agrégation et la formation de biofilms confèrent une résistance aux antimicrobiens, une coopération métabolique, la production de facteurs de virulence, ainsi que la survie et la persistance dans certaines niches écologiques ou hôtes**(Giaouris , E. et all.,2015)**.

En revanche, les agrégats perturbés ont montré une sensibilité significativement accrue aux deux antibiotiques **(Demirdjian, et *al,* 2019)**

6. Inconvénients sélectifs de l'autoagrégation dans la pathogenèse de la maladie :

L'auto-agrégation en l'absence d'adhérence à la surface cellulaire est désavantageuse pour les souches pathogènes dans l'infection car elle peut améliorer la compétition et la clairance immunitaire**.**

Auto-agrégation améliore la formation de biofilm, mais la couverture de surface globale du substrat/substrat La couverture de surface totale dépend de la surface cellulaire. Ainsi, l'hyper auto-agrégation conduit à la formation d'agrégats centraux et de biofilms plutôt qu'à des agrégats dispersés et à des biofilms diffus chez S. pyogenes de type sauvage. Pour contourner la colonisation réduite et la compétition de niche qui s'ensuit, certaines bactéries utilisent des forces de cisaillement pour déclencher leur attachement à des poches discrètes dans les tissus hôte (**El-shama Q. A. Nwoko, Iruka et all., 2021).**

7. Auto-aggregationt et biofilm :

L'auto-aggrégation et la formation de microcolonies sont l'une des premières étapes de la construction d'un biofilm.

L'autoagrégation peut conduire à la formation de microcolonies et de biofilms de deux manières.

D'abord, Les cellules planctoniques individuelles se fixent au substrat. Cela dépend de l'expression de l'adhésif de surface, Peut-être aussi un facteur de motilité (**O'Toole GA, Kolter R., 1999).** Ces cellules recrutent ensuite d'autres cellules à partir de la suspension.

Auto-agglutinine conduisant à la formation de microcolonies (**Beloin *al*, 2008)** Alternativement, des cellules individuelles peuvent migrer le long de la surface. pili de type IV et Collectivement (**O'Toole GA, Kolter R., 1998**)Un autre mécanisme implique l'agglutination automatique des cellules en solution, Les agrégats se déposent sur le substrat et initient la formation de biofilm (**Kragh KN et al., 2016).** Ces deux mécanismes sont en même temps dans le jeu. À des densités cellulaires élevées, les cellules agrégées

Les cellules placées au sommet des agrégats ont un meilleur accès aux nutriments et donc aux cellules individuelles. Cependant, à de faibles densités cellulaires, les cellules agglutinées sont désavantagées car les cellules sont situées au centre. Le corps entier a un accès limité aux nutriments (**Kragh KNet *al*, 2016)** Prédire la forme des agrégats Impact sur la concurrence : les agrégats ronds sont plus performants et se propagent davantage à des densités de cellules plus élevées Les granulats qui maximisent la surface sont privilégiés lorsque la concurrence est moindre (**Melaugh, et *al*, 2016).**

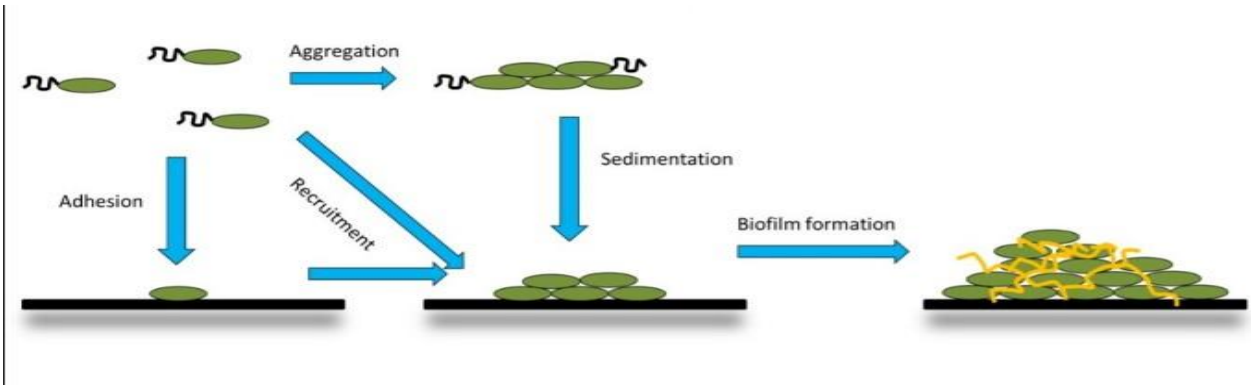


Figure 4: Rôle de l'auto-agrégation dans la formation de biofilm.

L'agrégation automatique peut provoquer ce formation de biofilm de deux manières :

Les bactéries planctoniques peuvent adhérer aux surfaces du substrat. En tant que cellule unique, il recrute ensuite plus de cellules planctoniques par agrégation pour former une seule cellule

Les microcolonies ou cellules planctoniques s'agglutinent en suspension et se déposent sur le substrat surface de l'eau. Les deux méthodes peuvent conduire à la formation de biofilm **Melaugh, et *al,* 2016).**

II. Partie Expérimentale

Matériels et Méthodes

1. Le matériel biologique :

*19 souche de staphylocoque aureus ont été fourni par notre promoteur monsieur Foudil; il s'agit des souches de *S.aureus* isolé à partir des mammites cliniques chez les ovins et les caprins.

* le prélèvement des chats malades et sains : on a reçu 12 prélèvements à partir des chats malades et sains.

Conféré le tableau02: les souches isole a partir *S.aureus*

Souches	Espèce concerné	Région
C1 – C2 – C3 – C4 – C5 – C6 – C7 – C8 – C9	Caprin	Ksar el chalala / Tiaret
O1 – O2 – O3 – O4 – O5 – O6 – O7 – O8 – O9 – O10 – O11	Ovin	Ksar el chalala / Tiaret
CM1	Chat	Ksar el boukhari
CM2	Chat	Ksar el boukhari
CM3	Chat	Berrrouaghia

2. Le protocole de prélèvement :

2.1. Ecouvillonnage nasale :

Les prélèvements chez le chat sont effectués par écouvillonnage nasal, et obtenu auprès des cabinets vétérinaires des régions précitées, en suivant les étapes suivantes :

- Insérer l'écouvillon dans la narine antérieure de l'animal (1-2 cm) et recueillir les Sécrétions nasales en effectuant 2 à 3 rotations complètes de l'écouvillon.
- Répéter la même procédure dans l'autre narine.

2.1.1. Matériel de prélèvement :

- Ecouvillons stériles.
- Glacière.

2.2. Technique de prélèvement du lait :

Les prélèvements du lait ont été réalisés au niveau de cabinet vétérinaire ou dans les élevages avant l'instauration de tout traitement selon les étapes suivantes :

1) Désinfection de l'extrémité du trayon avec coton hydrophile imbibé par l'alcool à 70° puis essuyage avec compresse stérile.

2) après avoir éliminé les premiers jets du lait, ouvrir le pot stérile d'une main en

gardant le capuchon disponible entre le pouce et l'index, et maintenir le tube incliné à 60° pour éviter la pénétration les impuretés.

3) prélever environ 10 ml de lait et le fermer immédiatement pour éviter la contamination.

4) Marquage et identification de chaque pot avec des étiquettes portant la date du prélèvement, la race, du nom du lieu de prélèvement.

5) Les pots sont transportés dans la glacière à T+4 C° (sous régime froid) et acheminés vers le laboratoire pour les ensemencées au bout de 48 heures.

Remarque : Les échantillons peut être stockées dans le réfrigérateur à T+4C°(période de stockage ne dépasse pas2-5jour), ou mise en culture directement après leurs arrivé au laboratoire si possible.

2.2.1. Matériels de prélèvements :

Le matériel nécessaire pour le prélèvement :

− Glacière isotherme avec bains de glace.

− Pots de prélèvement stériles à bouchon hermétique de 60ml.

− Gants à usage unique.

− compresse stérile et l'Alcool à 70°.

− Marqueur indélébile.

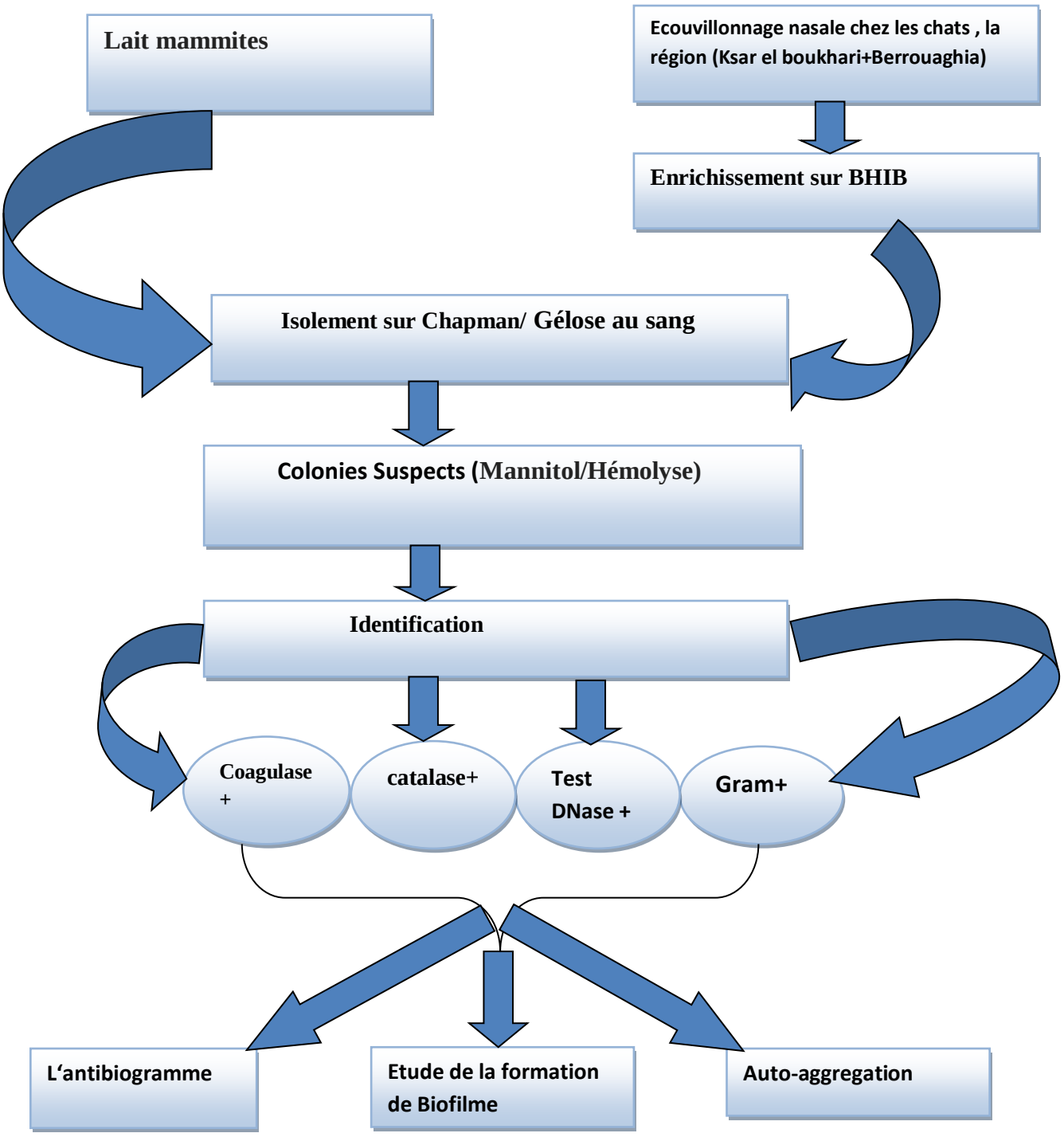


Figure 14 : Organigramme représentant les étapes de l'étude

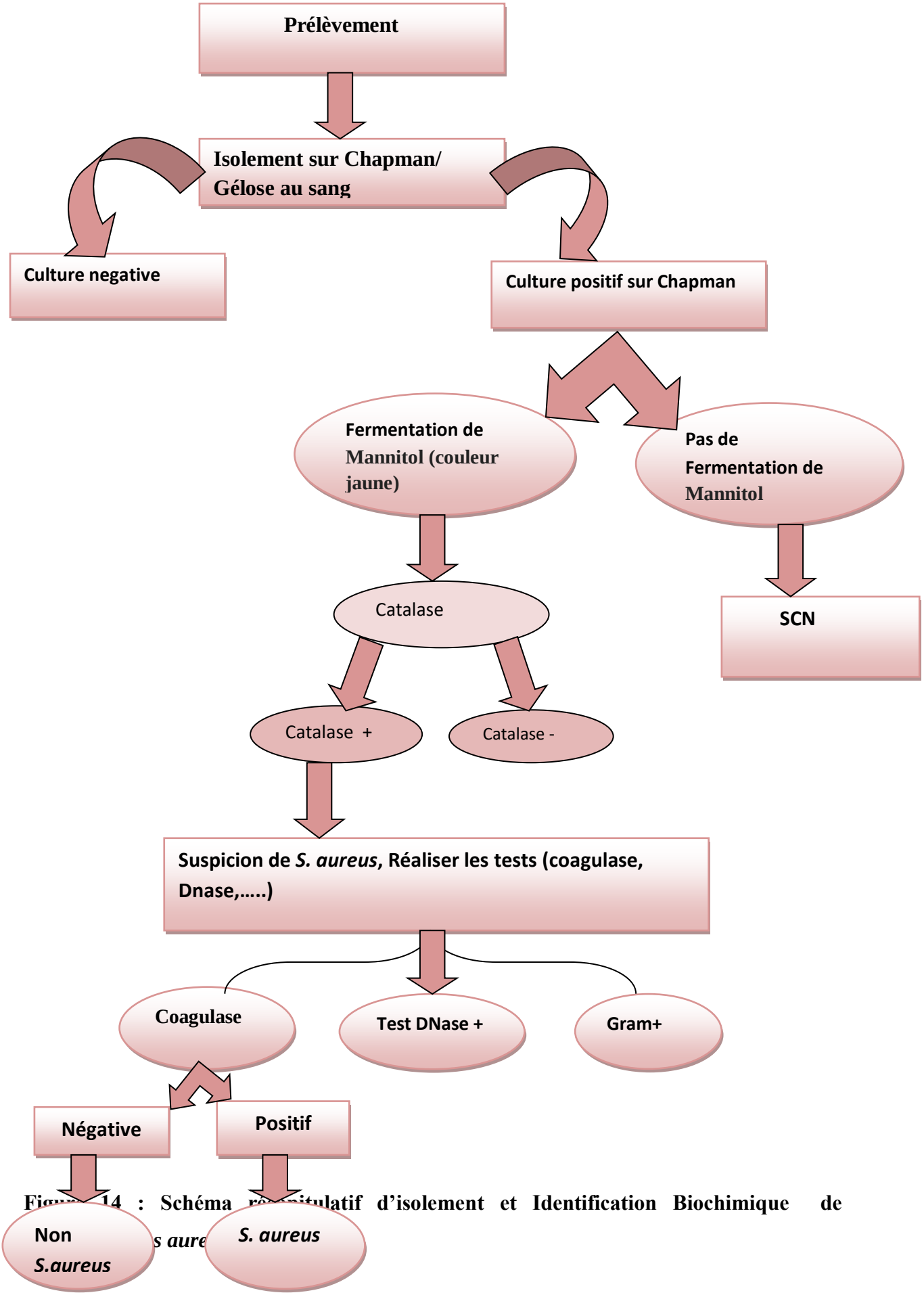


Figure 14 : Schéma récapitulatif d'isolement et Identification Biochimique de *s aure*

1. **Ensemencement (culture):**

3-1 : Enrichissement :

- L'enrichissement a pour but de faciliter la détermination de la présence des microorganismes dans les échantillons prélevés et les développer pour obtenir le plus grand nombre afin d'assurer leur présence et de faciliter leur étude.
- Pour cela, nous réalisons en plaçant chaque écouvillon dans un tube contenant le BHIB et en le laissant dans l'incubateur pendant 24 heurs. Tous les échantillons sont numérotés, un code est établi vers l'endroit d'où l'échantillon a été prélevé.

3-2 : Isolement :

*L'isolement a été effectué sur milieu Chapman sélectif pour les staphylocoques par étalement et épuisement sur gélose (pour la recherche des *Staphylococcus aureus*) comme suivant :

* A l'aide d'une anse de platine prendre une goute, déposer sur la gélose et ensemencer par des stries simple.

* Incuber les boites pendant 24 à 35-37°C.

4. Purification et conservation :

Pour purifier les souches de *Staphylococcus* isolées, des repiquages successifs sont réalisés sur le même milieu d'isolement (Chapman) ou à défaut sur un autre milieu moins sélectif qui est la gélose nutritive ou BHIB. Une coloration de Gram est faite à chaque fois pour contrôler la pureté des souches. La conservation est faite sur BHIB+25%Glycérolé dans un congélateur, à température -20C°, pour une utilisation ultérieur (antibiogramme).

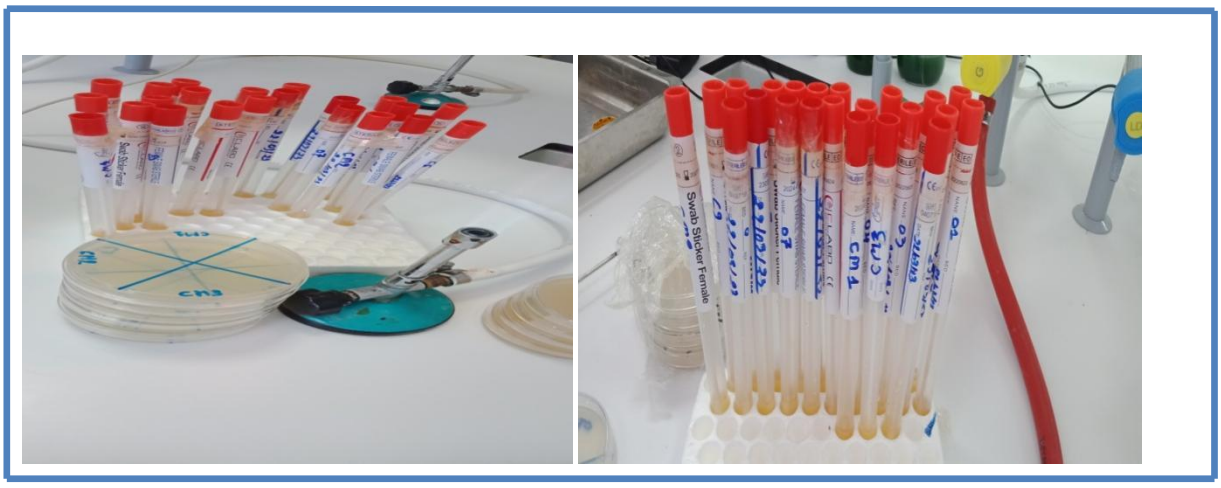


Figure 7: conservation des souches isolées dans de BHIB glycérolé (25%) à-20

4.1. Revivification des souches :

Les souches conservées à -20C°, sont revivifiées par repiquage sur gélose nutritif, et incubées

à l'étuve à 35C°+-2C° pendant 18-24h.

2. Identification des souches :

Une fois que les souches sont purifiées, l'identification morphologique et biochimique s'impose.

5.1 Identification morphologique

5.1.1 Examen macroscopique :

Repose sur l'aspect des colonies sur milieu de culture :

Sur Chapman *S. aureus* se présente souvent sous forme de colonies grand, pigmentées et entourées d'une auréole jaune car le germe fermente le mannitol.

En gélose nutritive, on obtient des colonies rondes, en forme de dôme, brillantes, opaques, bien définies, colorées après 24 heures, et pouvant alors prendre une coloration jaune doré, parfois jaune citrine pour *Staphylococcus aureus*

Dans les milieux de gélose au sang, des zones d'hémolyse prononcée (bêta-hémolyse) sont souvent observées autour des colonies. La plupart des souches de staphylocoques se développent sur des milieux synthétiques contenant du glucose, des sels minéraux, des acides aminés (dont la cystéine), de la vitamine B1 et de la niacine.

5.1.2 Examen microscopique :

L'étude de l'aspect microscopique se fait par la coloration de Gram comme première étape de l'identification du genre. Elle est assurée par l'observation microscopique des bactéries et renseigne sur la forme des bactéries : Cocci ou bacille et sur leur mode d'agencement, ainsi sur leur classement en deux grands groupes, celui des Gram positif et Gram négatif.

Mode opératoire : Avant de procéder à la coloration, un frottis doit être préparé comme suit :

-Étaler sur une lame propre une colonie prélevée à l'aide d'une anse dans une goutte d'eau physiologique ;

- Sécher à la flamme puis fixer le frottis. Une fois refroidi, nous entamons la coloration de Gram :

-Recouvrir le frottis avec le violet de Gentiane et laisser agir pendant une minute ;

-Rejeter le colorant et recouvrir la lame avec le lugol, laisser agir 45 secondes puis le renouveler avec la même durée ;

- Rejeter et décolorer à l'alcool pendant 30 secondes ;

- Rincer la lame avec de l'eau ;

- Recouvrir le frottis avec de la fushine et laisser agir une minute.

-Rincer la lame et laisser sécher avant de passer à l'observation microscopique.

Lecture : les *Staphylococcus* se présentent sous forme de diplocoques et en Cocci en grappe de raisin.

5.2 Identification biochimique :

5.2.1 La catalase :

-Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques qui n'ont pas de métabolisme aérobie. Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H2O2. On dispose une goutte d'eau oxygénée (H2O2) sur une lame et on y émulsionne une colonie de bactéries. Une réaction positive se traduit par un dégagement de bulles d'oxygène. La réaction est positive avec les staphylocoques.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

A - Mode opératoire : Prendre une lame propre, déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose.

B - Lecture : Un test positif se traduit par un dégagement de bulles de gaz.

5.2.2 La coagulase :

Le test de la coagulase différencie les souches de *Staphylococcus aureus* des autres espèces à coagulase négative (SCN).

La coagulase est une protéine semblable à une enzyme qui provoque la coagulation du plasma en convertissant le fibrinogène en fibrine. Le *Staphylococcus aureus* produit deux formes de coagulase :

1. **Coagulase libre** : Convertit le fibrinogène en fibrine, la coagulase libre est détectée par le test de coagulase en tube.
2. **Coagulase liée** : La coagulase liée à la paroi cellulaire (c'est-à-dire le facteur d'agglutination) est détectée par le test de coagulase sur lame.

❑ Pour les deux tests, des grumeaux ou des caillots de toute taille indiquent une réponse positive.

5.2.2 .A. Coagulase libre :

***Le test de coagulase en tube** est effectué en mélangeant des cellules bactériennes dans un plus grand volume de plasma dans un petit tube à essai.

5.2.2.B. Comment faire Le test de la coagulase en tube :

❶ Étiquetez le tube à essai avec le numéro de la souche à tester.

❷ À l'aide de la pipette, transférez de manière aseptique 0,5 ml du plasma(EDTA) reconstitué dans le tube à essai.

❸ Sélectionnez deux ou trois colonies isolées de bactéries à tester et collectez-les à l'aide de la boucle stérile ou du bâtonnet applicateur.

❹ Émulsionnez les bactéries dans les 0,5 ml de plasma et les placer dans l'incubateur

❺ Notez l'heure à laquelle le test a commencé. Observez la culture à intervalles réguliers, au cours des quatre heures qui suivent, à la recherche de la présence d'un caillot. Toute formation de caillot est un résultat positif.

❻ Si aucun caillot n'est observé au bout de 4 heures, l'essai peut être poursuivi avec une incubation pendant une nuit à la température ambiante et une observation finale à 24 heures.

❼ L'organisme de contrôle positif devrait présenter une coagulation au bout de 24 heures, contrairement à l'organisme de contrôle négatif.

❽ Une fois le test terminé, éliminez les matériaux contaminés de manière appropriée

Lecture: Le test est considéré comme positif lorsqu'on observe une prise en masse totale du plasma ou un caillot moins compact.

5.2.3. DNase Test:

S. aureus possèdent des enzymes capables de dégrader l'ADN. La gélose à l'acide désoxyribonucléique (A.D.N.) est un milieu destiné à la mise en évidence de la désoxyribonucléase des bactéries (Les bactéries possédant une désoxyribonucléase hydrolysent l' A.D.N)

La zone d'hydrolyse est mise en évidence par l'addition d'acide chlorhydrique à la surface du milieu, ce qui provoque la précipitation de l'A.D.N. et l'opacification du milieu. Il y a présence d'un halo clair autour de la culture si l'A.D.N a été hydrolysé.

Lecture: positive au présence des *staphylococcus aureus*

6. Test de sensibilités aux antibiotiques :

L'antibiogramme est une technique de laboratoire pour tester la sensibilité d'une souche bactérienne contre un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus. L'antibiogramme est effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose à partir de disques d'antibiotiques selon les recommandations du National Committee for Clinical La boratory Standard. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

a- Mode opératoire :

- Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement (gélose nutritive, Chapman). Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une pipette Pasteur, déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et ajustée jusqu'à atteindre une opacité équivalente à une densité optique (DO) de 0.08 à 0.10 lue à 570 nm.

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum. Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche (milieu MH), de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Cinq à six disques d'antibiotiques différents sont appliqués par boîte, ils sont espacés de 24 mm, centre à centre. Chaque disque d'antibiotique est appliqué à l'aide d'une pince stérile, le disque ne doit pas être déplacé.

-Les boîtes sont, ensuite, incubées immédiatement pendant 18 heures à 37°C.

b- Lecture : l'inhibition de croissance conduit à la formation d'une zone claire (zone d'inhibition) autours des disques d'antibiotiques. La lecture de l'antibiogramme se fait en mesurant à l'aide d'une règle graduée les diamètres d'inhibition autour des disques en mm, et par la suite on va classer la bactérie dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire, résistante.

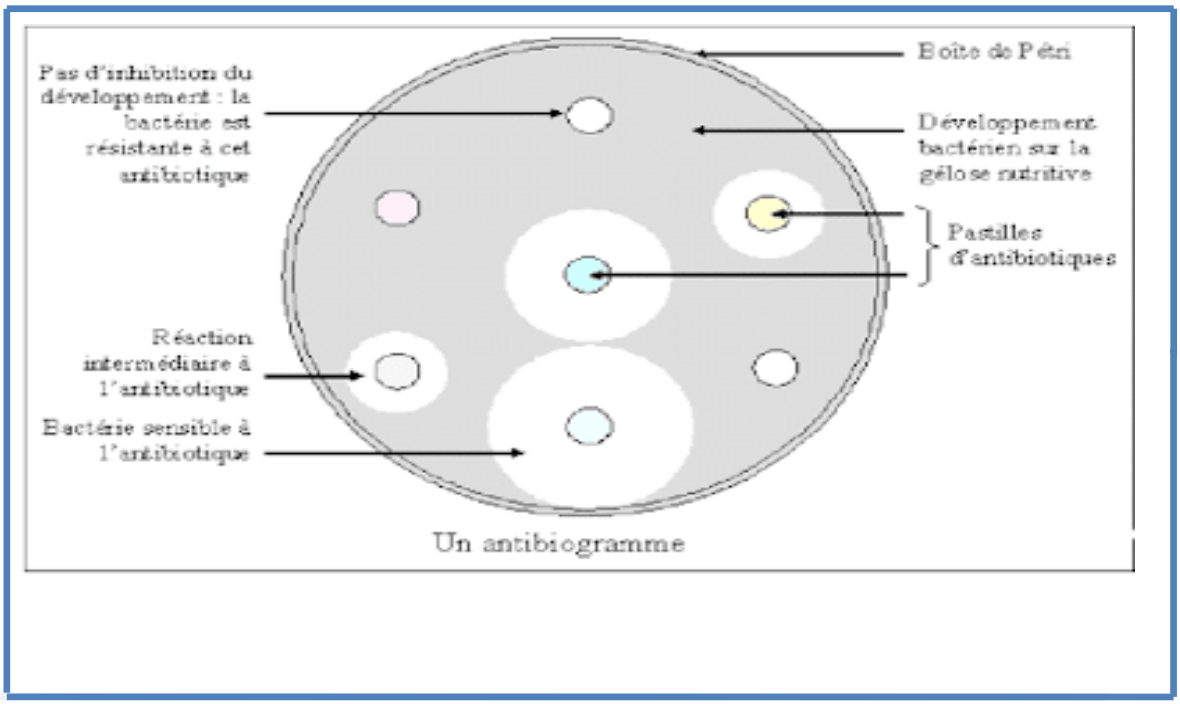


Figure 8: Les zones inhibition (antibiogramme).

Familles	Antibiotique	Charge du disque
Béta-lactamines	Pénicilline(P)	10µg
Béta-lactamines	Cefoxitine(FOX)	30µg
Quinolones	Ciprofloxacine(CIP)	5µg
Tétracyclines	Tétracyclines(TE)	30µg
Aminoglycosides	Gentamicine(GN)	10µg
Aminoglycosides	Amikacine(AK)	30µg
Lincosamides	Clindamycine(CD)	2µg
Autres molécules	Bacitracine(BA)	10µg
Macrolides	Erythromycine(E)	15 µg
Sulfamides	Cotrimoxazole(COT)	30µg

Tableau03: Liste d'antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

7. Etude la formation de biofilm in vitro :

7.1. la technique utilisé(TCP):

La technique de culture de plaque (TCP) a pour but d'évaluer semi quantitativement la formation de biofilm. La technique de TCP présente une forte corrélation et a été très satisfaisant en terme de détection de phénotypes positifs au biofilm, avec une discrimination aisée entre producteurs et non producteurs forts, modérés ou faibles, mais les producteurs faibles étaient difficiles à distinguer des isolats à biofilm négatif. **(Oliveira A, Cunha M.L.R.S (2008)).**

7.1.1. Condition de choix de technique :

Les plaques pour la culture du biofilm doivent être des plaques stériles de micro titrage en tissu de polystyrène à 96 puits à fond de la forme (U) avec couvercle. Le processus de formation du biofilm commence par la fixation initiale des bactéries à une surface, qui est affecté par un certain nombre de facteurs, y compris les caractéristiques de la surface à laquelle adhèrent les bactéries. Il existe différents types de plaques de microtitration conçu à des fins différentes. L'idéal pour la formation de biofilm est d utilisé La plaque de microtitration préparée pour la culture tissulaire implique que sa surface était spécialement traitée pour permettre une excellente fixation cellulaire et prolifération**,** en absence des plaque de culture tissulaire on a utilisé les microplaque 96puits en polystéréne , qui sont largement

utilisé pour étudier la formation de biofilm chez les différentes espèce bactérienne surtout chez S. aureus **(Kord M et *al,* 2018).**

7.1.2. Protocol de technique TCP :

7.1.3. Effet de l'inoculum :

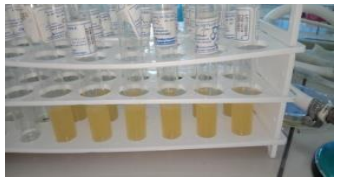
Différent inoculum sont utilisé pour étudier la formation de biofilm chez *S.aureus*, pour étudier l'effet de l'inoculum on a utiliséplusieurs inoculum de *S.aureus*, et enfin on a comparé les résultats obtenu , avec les mêmes protocole de coloration et de lecture .on a utilisé trois inoculum:

1-inoculum 1 :100 : à partir d'une culture de S.AUREUS DE 18 H SUR BHIB glucosé5% on a préparé un inoculum diluée a 1 :100

2-inoculum 0.5mcf/ a partir d'une culture de S.AUREUS DE 18 H SUR GN on a préparé un inoculum, l inoculum est calibré a 0.5 mcf, équivalent à $5*10^{-8}$ucf.

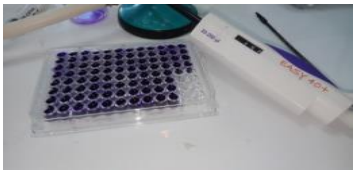
3-inoculum 0.5mcf diluée 1 :100

Des souches ont été cultivées pendant 18 h à 37°C dans bouillon BHIB supplémenté avec 5% de glucose. La culture a été dilué **1 :100** dans un milieu frais de BHIB supplémenté aussi avec 5% de glucose. Des puits individuels de plaques de culture tissulaire stériles en polystyrène à 96 puits à fond de forme (U) ont été inoculés par 200 µl de BHIB dilué a 1 :100 et ensuite incubés. Les puits de contrôle négatifs (témoin) contiennent 200 µl du BHIB supplémenté avec 5 % de glucose sans inoculum par puits Après 24 h d'incubation à 37 °C ; le contenu de chaque puits a été retiré par une micropipette attentivement après et lavé 4 fois par PBS stérile pour éliminer le flottement de bactérie libre «planctonique». Les cellules adhérentes attachées «sessiles» à chaque puits ont été teint avec 0.1 % de cristal violet pendant 10 min. La plaque a été lavée deux fois par PBS stérile pour éliminer l'excès de colorant, puis on ajout l'éthanol pendant 2 min. La densité optique du biofilm adhérent a été lue par un lecteur de microplaque SAFAS **(Kord M et *al,* 2018).**





01-Préparation de. suspension | 02-Ensemencement sur microplaque. | 03-Evacuation par micropipette.


04- Lavage par PBS. | 05-Coloration. | 06-Lecture par SAFAS.

Figure 9: Les étapes de préparation de microplaque pour le test biofilm +la lecture.

7.1.4. Principe de lecture sur TCP :

L'estimation quantitative du biofilm a été réalisée par dosage sur plaque de microtitration environ 200 µl d'éthanol à 96 % ont été ajoutés pour chacun de puits. Les plaques ont été lues à une longueur d'onde de 570 nm en utilisant un lecteur SAFAS, basé sur valeur de densité optique. **(Stépanovic .2007)**

L'adhérence de l'organisme a été classée comme suit **(Kord M et all., 2018).**

Tableau04: Les catégories de biofilms en fonction de densité optique

Valeurs moyennes de DO	Estimation de biofilm
$DOt < DO \leq 2 \times Dot$	*Faible*
$2 \times DOt < DO \leq 4 \times Dot$	*Moyen*
$4 \times DOt < DO$	*Fort*

DO: densité optique, DOt: densité optique du témoin.

7.2. Inoculum départ 0.5Mcf :

II * l'inoculum est préparé à partir de bactéries cultivées sur plaque de gélose .

* Prendre 3 à 4 colonies sont identiques bien isolé sont mise en suspension de 5ml de eau distillé.

* La turbidité de la suspension bactérienne doit être ajusté par obtenir une turbidité optiquement comparable à celle de l'étalon 0.5mc (McFarland). Il est préférable d'effectuer cette étape en utilisant un appareil photométrique.

* Alors les puits de la plaque de microtitration sont remplis avec 180 ml de BHIB+glucose stérile par la suite, une quantité de 20 ml de l'inoculum 0.5mc préalablement préparées est ajoutée dans chaque puits.

* Après une incubation 24hours en suivant les mêmes étapes de Technique de plaque de culture de tissu.

***** le lavage, la fixation, la coloration, séchage et la lecture ont les mêmes étapes de Technique de plaque de culture de tissu.

7.3. Inoculum départ 0.5Mcf est dilué 1 :100 :

* l'inoculum est préparé à partir de bactéries cultivées sur plaque de gélose.

* Prendre 3 à 4 colonies sont identiques bien isolé sont mise en suspension de 5ml de eau distillé.

* La turbidité de la suspension bactérienne doit être ajusté par obtenir une turbidité optiquement comparable à celle de l'étalon 0.5mc (McFarland). Il est préférable d'effectuer cette étape en utilisant un appareil photométrique.

* La culture a été dilué 1 :100.

* Alors les puits de la plaque de microtitration sont remplis avec 200 ml.

* Après une incubation 24hours en suivant les mêmes étapes de Technique de plaque de culture de tissu.

* le lavage, la fixation, la coloration, séchage et la lecture ont les mêmes étapes de Technique de plaque de culture de tissu.

8. Observation de Biofilm Par microscope optique :

- on faisant croitre une souche forte productrice de biofilm sur une lame posée au centre d'une boite de pétri vide, et mettre quelque gouttes de bouillon BHIB ensemencé par la souche productrice de biofilm sur la lame (**CATHERINE HARRISON-BALESTRA, et *al* 2023).**

-Etape :

1- préparer l'inoculum avec BHIB+Glucose et diluer 1 :10

2- déposer sur la lame et incuber 24hours

- puis :

1-laver par PBS.

2-10min lugol.

3- séchage 20 à 30min

4- coloré par le mélange rouge congo + 10% à tween 80

5- coloration par fushine pendant 6min et rincé à l'eau distillé

6- séchage

7- cristal violet et rincé à l'eau distillé

8- observation sue le microscope.

9. Evaluation de l'effet de NaCl sur le pouvoir de formation du biofilm :

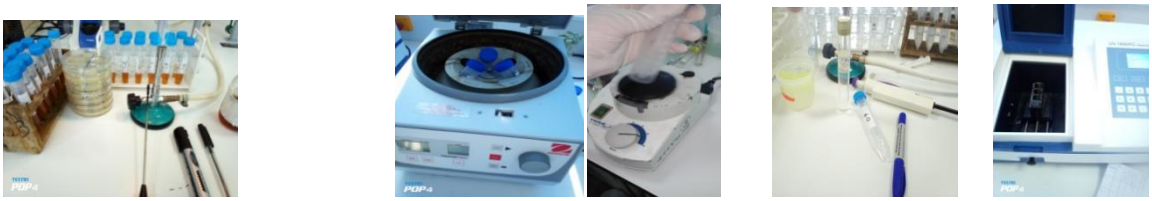
Afin de déterminé l'effet des différentes concentrations de NaCl sur la capacité de formation de biofilm, la technique a été effectué suivant les travaux de **(Stepanovic S et *al,* 2007)** avec des modifications minimes. Les souches de Staphylocoque ont été cultivé séparément dans 5ml de BHIB à 37°C pendant 24h, une suspension bactérienne de 20 µL est additionné à 180µL de milieu BHIB additionné de 2% et de 6% de NaCl dans des microplaques stérile à 96 puits en polystyrène en forme "U", les microplaques sont incubéà 37°C pendant 24h. Les puits sont vidé est rincés trois fois par PBS, puis 200 µl d'éthanol est additionné pendant 15min pour fixer les cellules bactériennes, l'éthanol est ensuite éliminer et les puits sont coloré par 200 µl de Crystal Violet à 0,5% dans chaque puits pendant 5min. le Crystal violet est éliminé et les puits sont rincé trois fois par PBS.

Enfin, 200 µL d'acide acétique est ajouté dans chaque puits et laissé pendant 5min, la densité optique (DO) est mesurée à 570nm par le lecteur SAFAS.

Remarque : Les puits de contrôle négatif contiennent uniquement du bouillon : 200 mL de BHIB+Glucose seulement.

9. Auto-agrégation :

Des tests d'auto agrégation ont été effectués selon (**Del Reet *al,* 2000 avec certaines modifications)**. Les bactéries ont été cultivées pendant 18 h à 37 ° C avec MRS solide ou milieu liquide. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000 g pendant 15 min, lavé deux fois et remis en suspension dans leur surnageant culturel fluide ou dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pour donner viable Comptes d'environ 10^8 CFU ml^{-1}. Suspensions cellulaires (4 ml) ont été mélangées par vortex pendant 10 s et l'auto agrégation a été déterminée pendant 4 h d'incubation à température ambiante. Chaque heure 0,1ml de la suspension supérieure était transféré dans un autre tube avec 3,9 ml de PBS et le L'absorbance (A) a été mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'auto agrégation est exprimé:1-(À/ A0)×100, où représente l'absorbance au temps t =1, 2, 3 ou 4 h et A0 l'absorbance à t=0.



1/Préparation de suspension 2/ Centrifugation 3/vortex 4/Dilution 5/ L'absorbance (A)

Figure10 : Les étapes de préparation pour le test auto-agrégation

11. Analyses statistiques :

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de STATISTICA.

Toutes les expériences ont été répétées quatre fois. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type. Les différences significatives entre les moyennes ont été évaluées à l'aide d'une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA).

1. **Répartition des prélèvements :**

- Durant quatre mois, allant de février au mois de mai 2023, parmi les 12chat malade qu'on a effectué des prélèvements nasals, on a trouvé 3 porteurs de *S .aureus*
- 19 souche de *S.aureus* isolé à partir des mammites cliniques chez les ovins et les caprins.

2 .Identification de *S. aureus* :

2.1. Identification morphologique

2.1.1. Aspect macroscopique :

La revivification des souches a été réalisée par un enrichissement sur le bouillon BHIB, l'incubation est fait à 37°C pendant 24h à partir des bouillons BHIB présente un trouble des ensemencements par stries sur boite contenant de la gélose MSA.

L'aspect des colonies sur MSA (Mannitol Salt Agar) entourées de zone jaunes après 24 heures d'incubation à 37°C a indiqué un résultat positif.

L'aspect des colonies sur gélose au sang gris-blanc avec une teinte jaunâtre allant du jaune à l'orange, lisse, et hémolytique.



Figure 11 : Après incubation de 24h du *S.aureus* sur MSA



Figure 12: Aspect morphologique des colonies

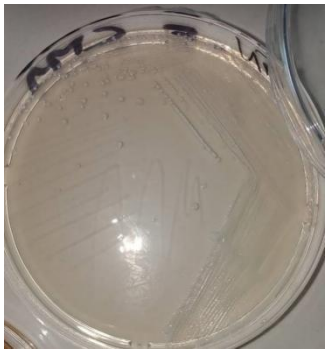
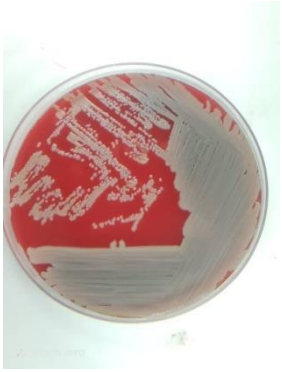


Figure 13: Aspect morphologique des colonies Du *S. aureus* en Gélose nutritive



Figure`14: Aspect morphologique des colonies du *S.aureus* au Sang

2.1.2. Aspect microscopique :

Après coloration de Gram *S.aureus* apparait sous forme Cocci Gram positif en diplocoque ou en amas (grappe de raisin) colorés en violet.

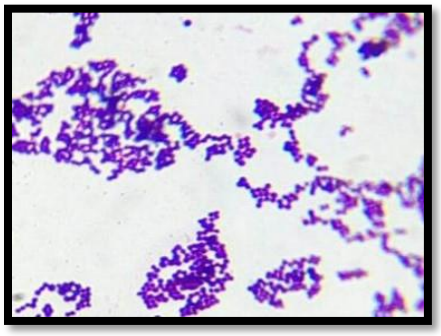


Figure 15:*S. aureus* sous microscope coloration de Gram (Gx100)

2.2. Identification biochimique :

2.2.1. Test de catalase :

Le test de catalase montre un dégagement des bulles de gaz produit par une colonie mise en contact avec l'eau oxygénée .Dont on trouve 23 souches à catalase positif.

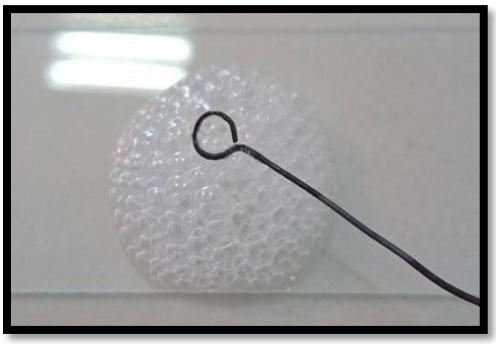


Figure 16: La mise en évidence de la catalase chez les *Staphylococcus aureus*.

2.2.2. Test de coagulase :

Les Cocci à Gram et catalase positive, testés pour la production d'une coagulase dont on trouve 23/43 des isolats à coagulase positif

Le test de coagulase est la méthode la plus fiable pour identifier *Staphylococcus aureus* ***(Kateete, et al, 2010).***

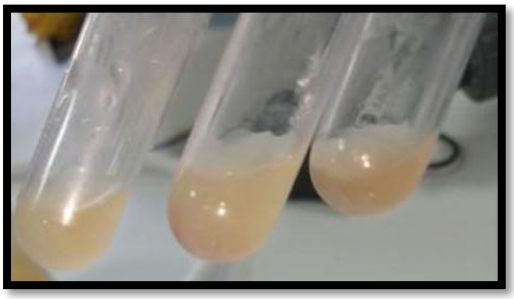


Figure 17: La mise en évidence de la coagulasse libre chez les *S. aureus (*coagulase + au centre et a droit , coagulase – a gauche)

2.2.3. Test DNase :

La zone d'hydrolyse présentée d'un halo clair autour de la culture si l'ADN a été hydrolysé.



Figure18 : Mise en évidence de l'ADNase

1. **Les résistances des souches de *staphylococcus aureus* aux antibiotiques :**

Les résultats d antibiogramme sont représentés :

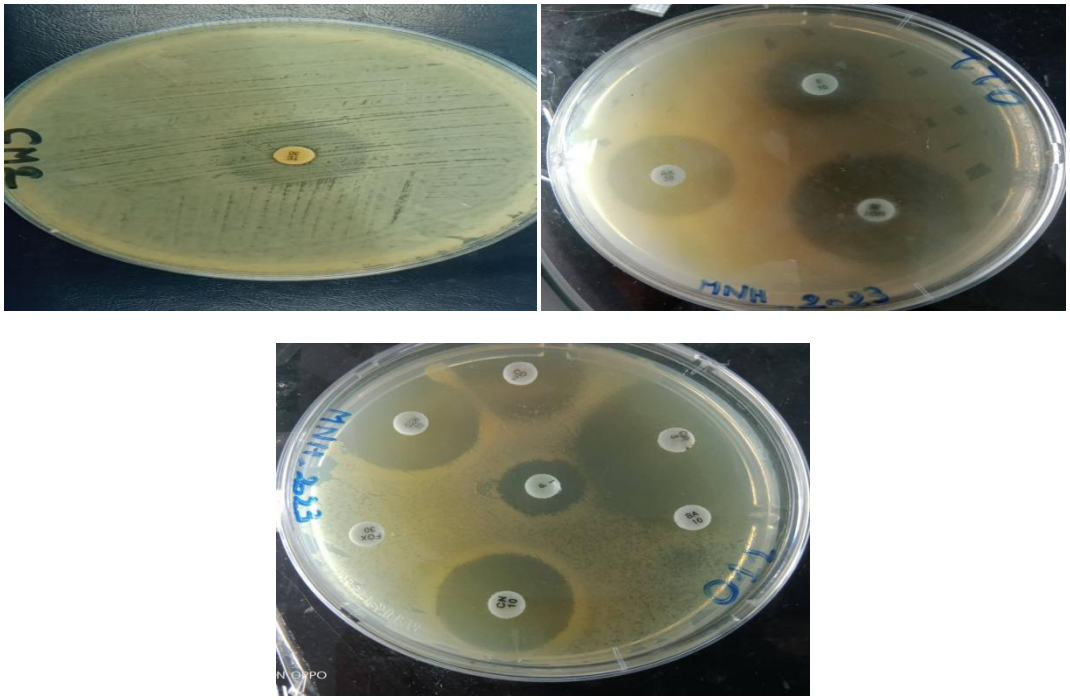


Figure 19 : profile de résistance aux antibiotiques des souches de *staphylococcus aureus* isolées.

Les résultats détails pour chaque souche ont sur (**annexe)** : Résultats d'antibiogramme détaillés par souche chez les ovins et chez les caprins et le chat.

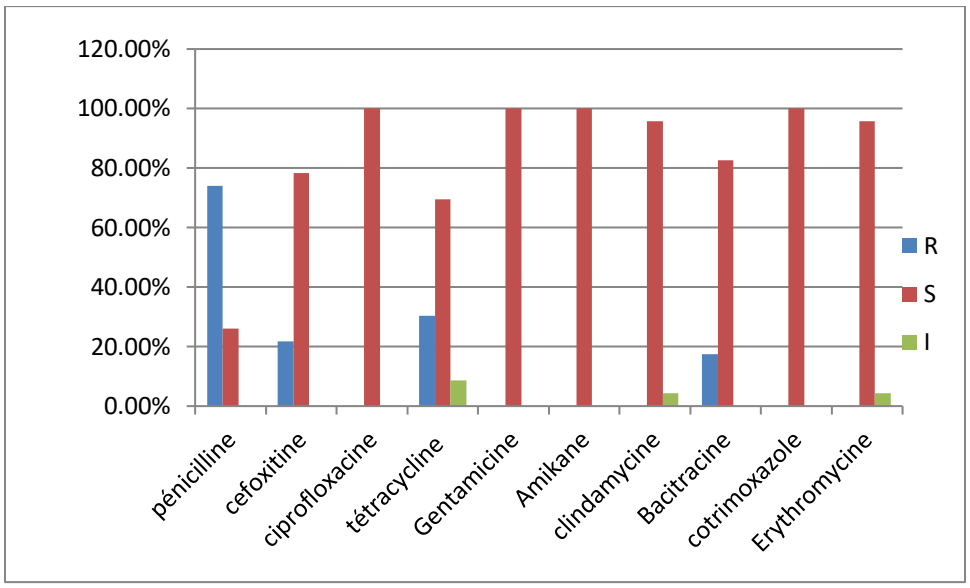


Figure20: profile de sensibilité et de résistance aux antibiotiques des souches de *staphylococcus aureus* isolées en (%)

Notre étude visait à étudier la résistance des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mammites cliniques chez les ovins et les caprins et chez les chats malades à 10 antibiotiques de différentes familles **(Tableau5, Figure20)**

Tableau5: profil de sensibilité et de résistance aux antibiotiques

	Résistante	Sensible	Intermédiaire
Pénicilline	73.91%	26.08%	0%
Cefoxitine	21.73%	78.26%	0%
Ciprofloxacine	0%	100%	0%
Tétracycline	30.43%	69.57%	8.69%
Gentamicine	0%	100%	0%
Amikane	0%	100%	0%
Clindamycine	0%	95.65%	4.34%
Bacitracine	17.39%	82.60%	0%
Cotrimoxazole	0%	100%	0%
Erythromycine	0%	95.65%	4.34%

A l'issue des tests de résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques, les résultats ont montré une pourcentage de résistance relativement importante à la Pénicilline 73.91% et une résistance de 30.43% envers la Tétracycline ,En revanche une résistance estimé à 21.73%pour la Cefoxitine ; ce qui représente un pourcentage élevé de SARM, et 17.39% de résistance pour la

Bacitracine Ces résultats sont inferieur a ceux rapporté par **(Hasan I. Idbeis en 2019)** S. aureus 100% résistance à la pénicilline et **(Weidong Qian et *al.* 2019)**qui a trouvé la majorité des isolées de mammites cliniques chez les caprins sont résistance à la pénicilline. Et supérieur a l'étude de **(Cengiz et *al.*2023)***S. aureus* isolé d'un chat 67,0 % résistants à la pénicilline.

La sensibilité est forte avec les antibiotiques : la Cotrimoxazole, Erythromycine, Clindamycine, Amikane, Gentamycine et Ciprofloxacine qui ont enregistré des pourcentages de100%, 95.65%, 95.65%, 100%, 100%, 100% respectivement donc une efficacité de 100%.

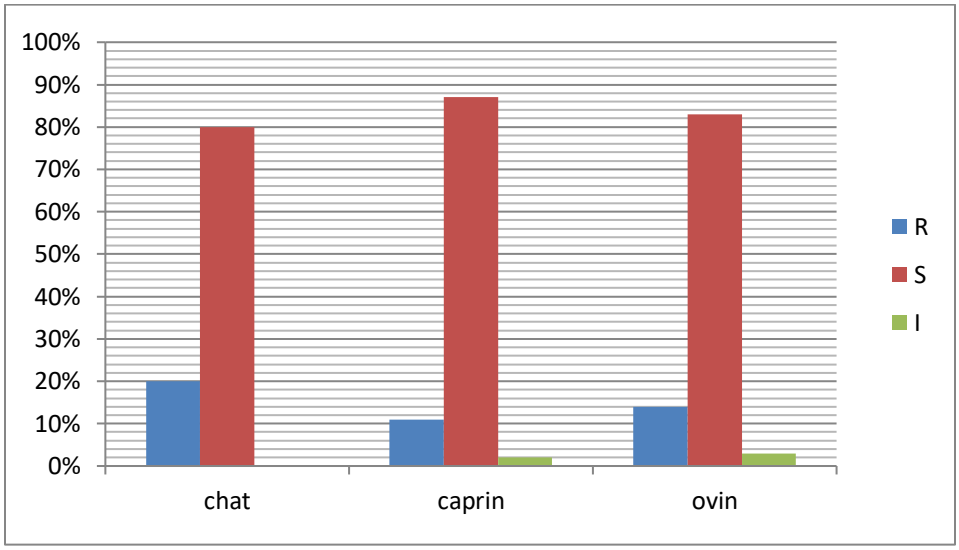


Figure21 : Pourcentage des antibiotiques efficace des trois espèces.

D'après la figure 21, plusieurs antibiotiques se montrent encore efficaces contre *S.aureus* d'origine animale malgré le pourcentage élevé des souches résistantes à un ou deux antibiotiques. La multi résistance ne concerne que les SARM.

Après la comparaison des résultats obtenus chez les trois espèces on trouve que le pourcentage des souches résistantes chez les chats est plus élevé par rapport aux ovins et les caprin, cela peut être expliqué par le fait, les carnivores domestiques peuvent être infectés ou colonisés par des micro-organismes pathogènes ou commensaux, représentant pour certains d'entre eux un problème de santé animale et de santé publique, notamment lorsque des bactéries multi-résistantes sont impliquées. Ces micro-organismes peuvent diffuser au sein des établissements vétérinaires, causant ainsi des infections nosocomiales aux facettes épidémiologiques variées ces résultats sont très proche a ceux rapporté par **(keck Nicolas et *al.* 2017).**Les carnivores domestiques peuvent être infectés ou colonisés par des micro-organismes pathogènes ou commensaux, représentant pour certains d'entre eux un

problème de santé animale et de santé publique et (**Pantosti A et *al.* 2012/ Loeffler A, Lloyd DH. 2010)**qui montre que les chiens et les chats ne sont généralement pas colonisés par *S. aureus* mais forment plutôt des associations transitoires qui peuvent parfois entraîner des infections graves.

Rich M et *al*. 2006 ; Weese JS et *al.* 2006 ont trouvé que les *Staphylococcus aureus* résistantes à la Méthicilline (SARM), causent d'importante infections nosocomiales et communautaires chez l'homme, est de plus en plus reconnu comme un agent pathogène chez les animaux de compagnie.

4. Technique de plaque de culture :

Après 24 heures d'incubation à 37C sur plaque de microtitration et coloration au cristal violet, la formation de biofilm a été quantifiée par lecteur SAFAS MP96UV à 570 nm, basé sur valeur de densité optique.

Tableau06 : Distribution des souches *S .aureus* formatrice de biofilm d'origine animal en %, avec un inoculum 1/100

Origine	Nombre des souches	Faible Formatrice	Moyen Formatrice	Forte formatrice
Caprin	9	00	66.66%	33.33%
Ovin	11	00	54.54%	27.27%
Chat malade	3	00	66.66%	33.33%

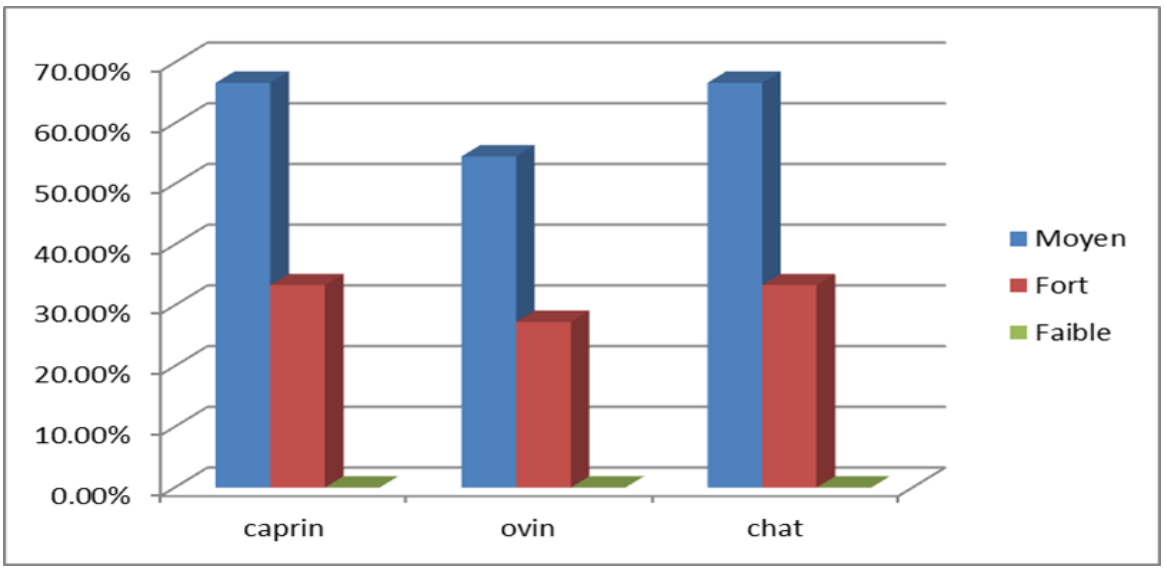


Figure 22: Distribution des souches *S. aureus* formatrice de biofilm inoculum dilué 1/100 en %

- Après l'analyse des résultats et par comparaison des valeurs de la densité optique (DO) pour chaque souche étudiées avec la densité de témoin, la densité optique Obtenu des 23 souches est élevé à celle de témoin, ce qui traduit leur formation de biofilm, donc toutes les souches montrent une formation de biofilm

  1-Pour les caprin on a 3/9 souches (33.33%) sont des fortes formatrice de biofilm; 6/9 souches (66.66%) sont des souches moyennement formatrices de biofilm, et 0/9 souches (0%) des souches faiblement formatrices de biofilm.

  2-Pour les ovin on a 3/11souches (27.27%) sont des fortes formatrice de biofilm; 6/11 souches (54.54%) sont des souches moyennement formatrice de biofilm, et 0/11 souches (0%) des souches faiblement formatrice de biofilm.

  3- Et finalement, pour les chats on a 1/3 souches (33.33%) sont des fortes formatrice De biofilm ; 2/3 souches (69.43%) sont des souches moyennement formatrice de Biofilm et 0/3 souches (0%)des souches faiblement formatrices de biofilm.

  Les biofilms sont une stratégie de survie et de résistance pour les bactéries, ce qui les rend extrêmement difficiles à traiter en raison de leur résistance aux antibiotiques. La présence de *S.aureus* sous forme de biofilm est un défi considérable pour la communauté médicale, après avoir adhéré aux surfaces, les cellules bactériennes adhérentes commencent à se diviser et à s'accumuler en présence d'une source de nutriments suffisante.

La formation de biofilms chez les bactéries pathogènes des animaux et les bactéries zoonotiques est un sujet relativement peu étudié. ***(Peng et al ,2023)***

- Selon les résultats de notre étude toutes les souches de *S. aureus* étudié étaient des formatrices de biofilm (100%), avec un taux de 30.42% des fortes formatrices de et 69.43% étaient moyennement formatrice, selon l'étude **(Silva V et *al,* 2022),** qui ont trouvé que toutes les souches isolées de différentes espèces animales ont produit un biofilm.
- Nos résultats sont en accord avec les travaux de (**Al ubaya et *al,* 2016**) et (**Hasan Idbeis et *al,* 2019**), qui ont montré les souches *S.aureus* sont 100% formatrice de biofilm, et sont supérieures avec ceux travaux obtenues par (**Al idani et *al,* 2016**) et ces auteurs ont montré que seulement 80.6% des souches sont formatrice de biofilm.
- On constate aussi que les souch*es de S. aureus* isolées à partir des trois espèces présentent un pourcentage proche des souches forte formatrice de biofilm(27%-33%),(**Silva V et *al,* 2022**) ont montré que les souches qui produisaient moins de masse de biofilm étaient celles isolées à partir des mammites cliniques, qui comprenaient à la fois des souches de SARM.
- Il est suggéré par plusieurs chercheurs que la formation d'un biofilm favorise la persistance des bactéries dans la glande mammaire tout en diminuant l'efficacité des traitements aux antibiotiques. (***Tremblay YD et al, 2014)***

5. L'effet de l'inoculum sur la formation de biofilm :

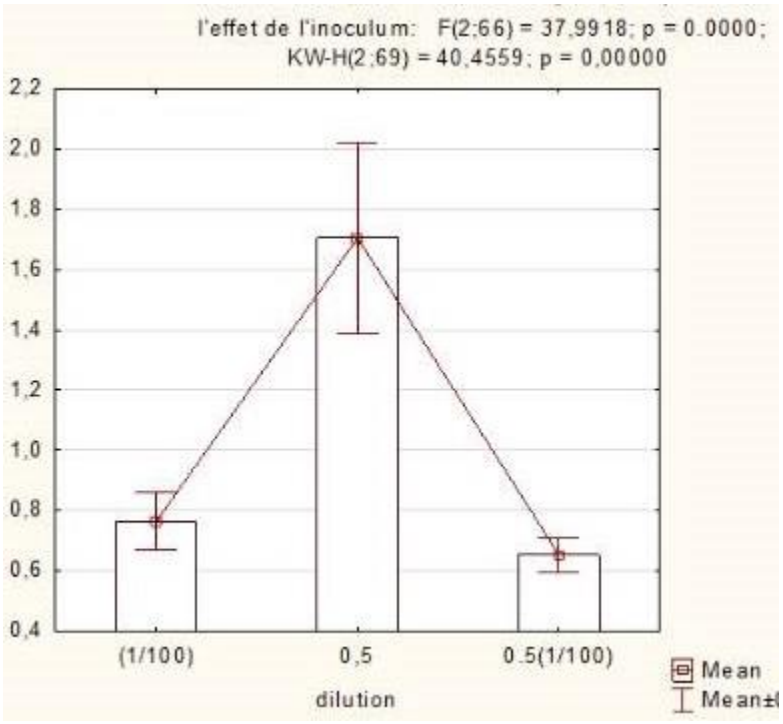


Figure 23 : L'effet de L'inoculum sur la formation de biofilm chez les *S.aureus*.

Les résultats obtenus montrent l'effet des trois inoculum déférents sur la formation de biofilm par 23 souches appartenant à *staphylococcus aureus* après24hd'incubation à 37C°.

La formation de biofilm des souches de l'inoculum de**0,5McFarland**, a présenté un taux de 82.61% forte formatrice et 17.39% moyenne formatrice de biofilm.

La formation de biofilm des souches de l'inoculum **1 :100**, présenté un taux de 30.43% fort formatrice et 69.57% moyen formatrice, Avec et un taux de 17.40%fort formatrice à partir un inoculum de**0,5McFarland dilué.**

En comparant les résultats des souches *S. aureus* de l'inoculum **0.5 McFarland** présentent un pourcentage plus élevé un taux de 82.61% fort formatrice de biofilm, par rapport à les souches de **1 :100** un taux de 30.43% fort formatrice et un taux de 17.40% fort formatrice de l'inoculum de **0.5 dilué,** l'étude statistique par ANOVA a révélé que la formation de biofilm a augmenté ($p<0.00001$) avec l'augmentation de la taille de l'inoculum initial.

La modulation de la concentration de l'inoculum modifie la distribution de la biomasse (biofilm) et la taille des agrégats développés après une incubation de 24h ***(Lichtenberg M et al, 2022)***.

L'inoculum préparé à partir des bactéries cultivées sur gélose ressemble probablement plus à la situation in vivo que l'inoculum préparé à partir des bactéries cultivées en bouillon, la taille de l'inoculum influence considérablement la quantité de biofilm, c'est-à-dire que la densité de biofilm augmente avec l'augmentation de l'inoculum initial **(Stepanovic et *al*, 2007).**

1. **Evaluation de NaCl sur la formation de biofilms chez *Staphylococcus aureus* :**

La formation du biofilm pour chaque souche a été évaluée, en utilisant les plaques de microtitration. L'effet du Na Cl a été évalué en testant du trois concentrations différentes pour chaque souche après 24 heures d'incubation à 37C°.

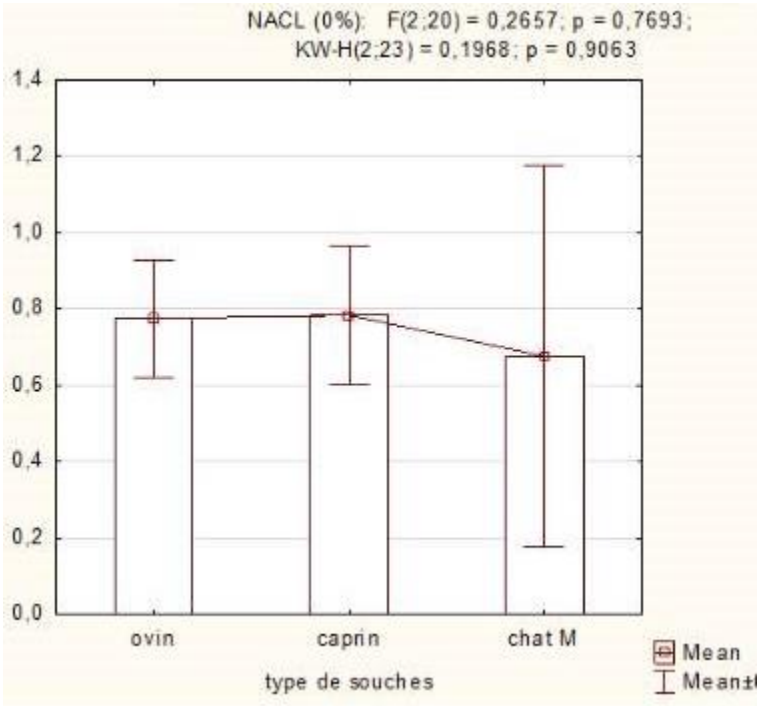


Figure 24: Effet du Na Cl à 0% sur la formation de biofilm (DO)

La figure montre la formation de biofilm en l'absence de Na Cl par 23souche de *Staphylococcus aureus* après 24h d'incubation.

On constate que la production de biofilm à un taux maximum élevé pour les caprins et les ovines et faibles réductions de la production de biofilm pour les chats.

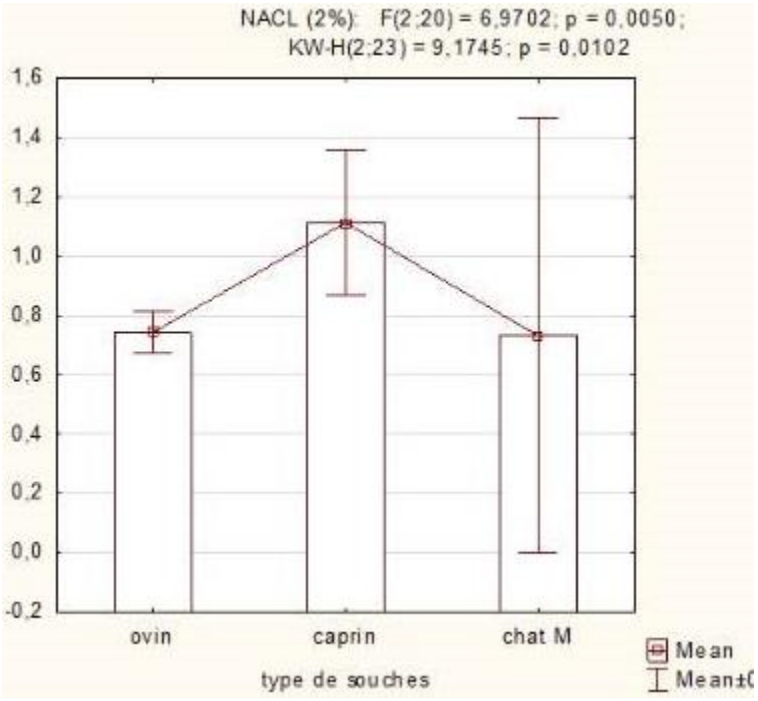


Figure 25: Effet du Na Cl à 2% sur la formation de biofilm(DO)

D'après la figure qui représente l'effet du NaCl à 2% sur la formation de biofilm par des souches appartenant aux *Staphylococcus aureus*.

On observe que la production de biofilm chez les souches isolé à partir les caprinatteint son taux maximal**1.497±0.49** lorsque la concentration du NaCl est égale à 2%, pour les souches isolé à partir les ovin et les chats atteint faible taux**0.945±0.095/1.055±0.225**par rapport aux caprins.

Nos résultats significative **p<0,005**montrent que le taux de production de biofilm augmente chez les caprins lorsque 2% de NaCl est ajouté.

Donc on constate une sensibilité plus élevé à l'effet de NaCl chez les souches caprines par rapport à la souche ovine et féline.

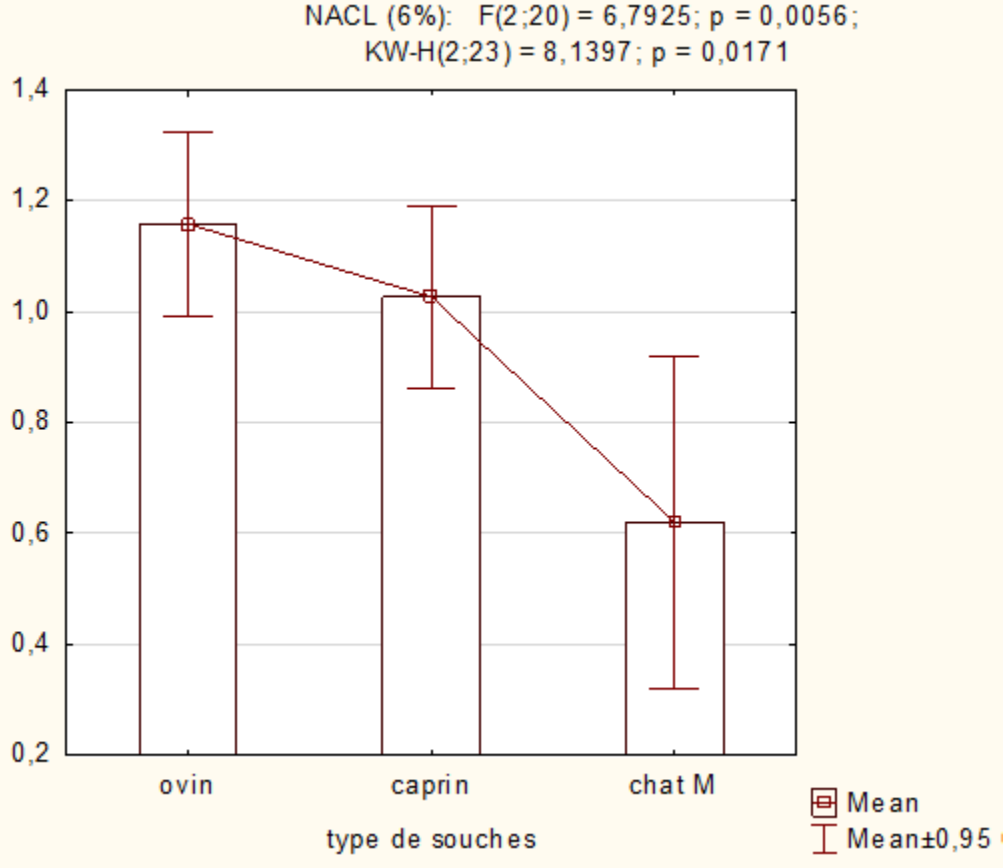


Figure 26 : Effet du Na Cl à 6% Sur la formation de biofilm (DO).

Les résultats obtenus à partir les souches de *S. aureus* isolé à partir des mammites cliniques chez les ovins et les caprins et les souches isolé à partir des chats malade étudiés montrent que la formation de biofilm atteint son maximum à une concentration de 6% de NaCl.

On remarque que le taux de production de biofilm augmente chez ovins **1.300±0.137**par rapport les caprins**1.040±0.299**et les chats **0.629±0.149.**

Nos résultats significative **p<0,005** montrent que il ya fort production de biofilm chez les ovins lorsque augmente la concentration a 6% de NaCl.

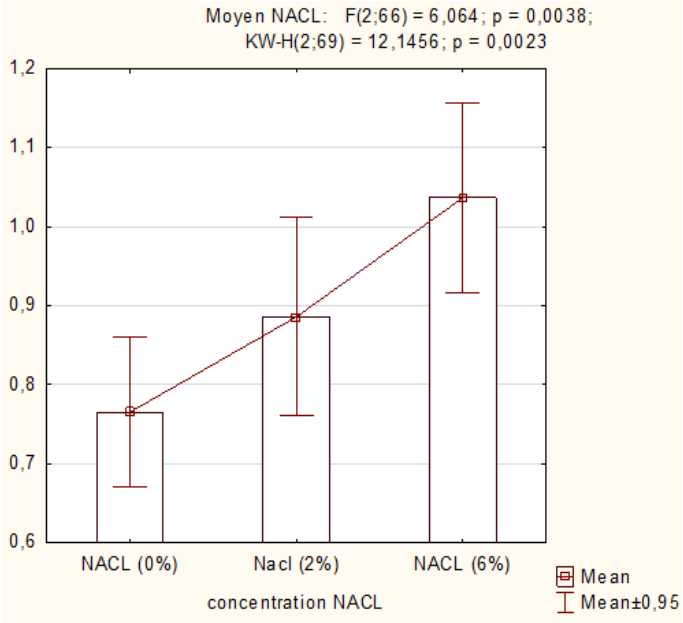


Figure 27: Effet du NaCl sur la formation de biofilm chez *Staphylococcus aureus*

En général, facteurs environnementaux, tels que le glucose, l'osmolarité, l'éthanol, la température et l'anaérobiose, ont été signalés comme affectant la formation de biofilm **(Gotz, F. et *al*.2002).**

Les résultats obtenus montrent l'effet du trois concentrations différentes NaCl sur la formation de biofilm par 23 souches appartenant à *Staphylococcus aureus* après 24h d'incubation à 37C°. On remarque que chez la plupart des souches de à *Staphylococcus aureus* la production de biofilm atteint son taux le plus élevé lorsque la concentration de Na Cl est de 6% .Des résultats similaires sont rapportés par une étude de **(Xu et *al.* 2010)** ont montré que l'agrégation cellulaire de *S. aureus* augmentait lorsqu'il était exposé à de fortes concentrations de Na Cl (jusqu'à 10 %).Les cellules vivantes dans le biofilm de *S. aureus* ont augmenté aux concentrations de NaCl les plus élevées plutôt qu'aux concentrations de NaCl de 0 % ou de 2 % **(Lee S et *al*.2014).**

La formation de biofilm par les 23 souches de *S.aureus* est passée de 30,43 % à 47,82 % après l'ajout de 2 % de Na Cl. La formation de biofilm a également augmenté à 78,26% à une concentration de Na Cl de 6 %.Ces résultats sont en conformité avec d'études ont également rapporté que le NaCl affecte l'augmentation de la formation de biofilm chez S. aureus ceux obtenus par **(Kennedy et O'Gara,et *al.* 2004 ; rode et al, 2007)** et (**Rachid, S.et *al* 2000)** Ils sont démontré qu'une osmolarité élevée, telle qu'une concentration élevée en Na cl, stimule la

formation de biofilm chez *S. aureus*. Parce que *S. aureus* est peu compétitif dans le microbiote et tolère le sel (10-15%) (**Bhunia A,et *al.*2008).**

Lim Y, et *al.*2004 Leur étude a montré que la base génétique de la formation du biofilm chez *S. aureus* est multifactorielle. Ils ont également identifié et cloné un nouveau gène, rbf, de *S. aureus* et ont montré que ce gène est essentiel à la formation du biofilm. Sur polystyrène et verre. Leurs données indiquent que Rbf, qui contient une région consensus de la famille des régulateurs de transcription AraC/XylS, est un régulateur qui régule la formation de biofilm en réponse au glucose et au sel. **(Lee S et *al.*2014)** ont montré que L'expression des gènes icaA était plus élevée à des concentrations de Na Cl de 4 % et 6 % qu'avec du Na Cl à 0 % d'environ 9 fois et 20 fois, respectivement. Ces résultats indiquent que le chlorure de sodium synthétisé peut augmenter les formations de biofilm de *S. aureus* en augmentant l'expression du gène icaA.

De manière plus importante l'addition des différentes concentrations de Na Cl dans les 23 souches étudiées a montré que la formation de biofilm était accélérée. Des résultats similaires ont également été observés avec des espèces de *Staphylococcus*.**(Lade H, et *al.* 2019)** mentionnés que l'ajout de Na Cl a également amélioré la formation de biofilm de plusieurs souches de S. aureus testées. De plus, ces résultats confirment que l'ajout de NaCl a amélioré l'assemblage, la stabilité et la résistance du biofilm de manière dose-dépendante, avec une expression accrue de 4 % d'opéron Ica et de 6 % de Na Cl**(*Rode TM,et al.2007 ; Moretro Tet al.2003 ; Kennedy CA et al.2004*)** Donc ces études prouvent que la modification de la pression osmotique dans le milieu de culture affecte la capacité de *S. aureus* à former des biofilms **(*Ying Liu, Jiang Zhang, et al.2020).***

Donc notre résultats significative **p<0,005** dans différentes concentrations de NaCl testées montrent que 19 souche de *S.aureus* isolé à partir des mammites cliniques chez les ovins et les caprins et 03souche isolé à partir des chats malades dans la région de Médéa étudiées sont capables de produire un biofilm.

7. Observation de biofilm par microscope optique:

Sur une lame on a posé au centre d'une boite de pétrie, ont été cultivées pendant 24 h à 37 ° C. La formation du biofilm est bien visualisée par notre microscopie optique et notre technique de coloration modifiée. Les souches fortes formatrices de biofilm sont colorées par le violet.

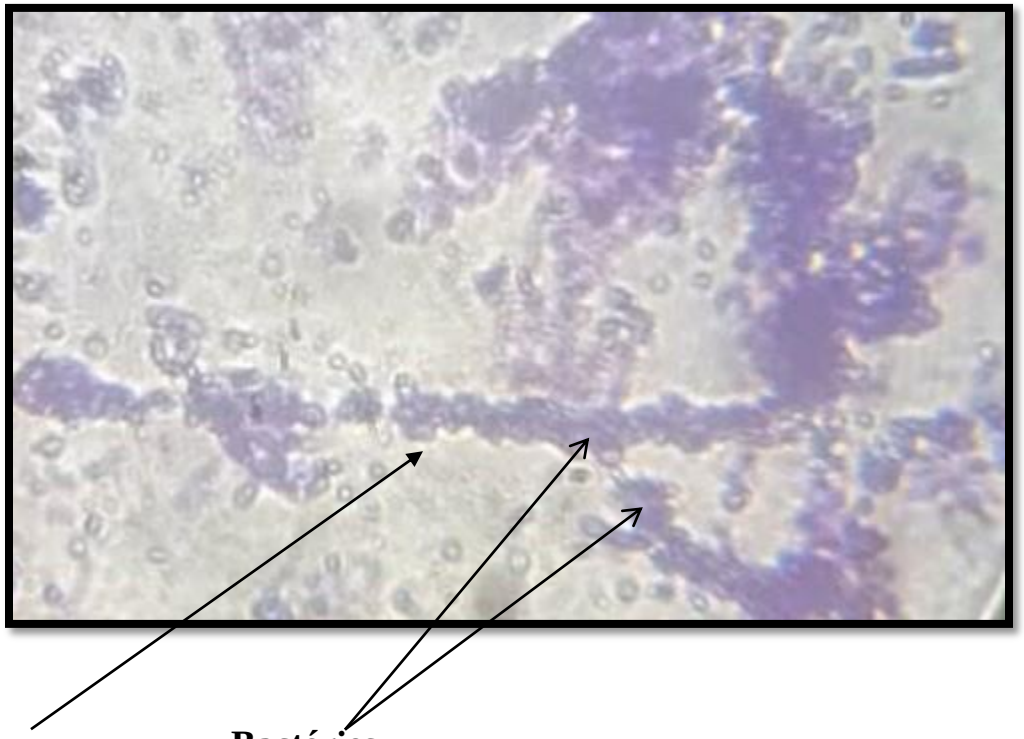


Figure 28 :L'observation de croissance de biofilm de *S.aureus* sous microscope optique (G x100)

Dans la figure28 représente la coloration de biofilm sur lame en verre, les colonies des *S.aureus* sont colorées en violet, les bactéries sont entourées par une zone claire qui représente l'EPS chez les *S.aureus* forte formatrice de biofilm.(**Sutherland IW et *al* .2001)**ont mentionnés quelle biofilm est produit par les bactéries et composé d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS), qui est composée de chaînes moléculaires très longues et minces qui peuvent s'associer de différentes manières. Le biofilm se forme lorsque des bactéries planctoniques s'attachent, et se fixent à une surface peuvent et commencent à sécréter leur EPS. Les EPS de nombreuses bactéries voisines peuvents'associer et former une épaisse couche visqueuse, ou biofilm, qui protège les bactéries des défenses de l'hôte et des antibiotiques **(CATHERINE HARRISON-BALESTRA.et *al* 2003)**

8. Test d'auto agrégation :

Le pourcentage de l'auto agrégation a était mesurer et calculer après incubation des souches 24hours à 37C°, d'après les résultats (**figure 29**), dans notre étude la capacité d'auto agrégation des souches a était évaluée par spectrophotomètre (VWR UV-multi1600PC).

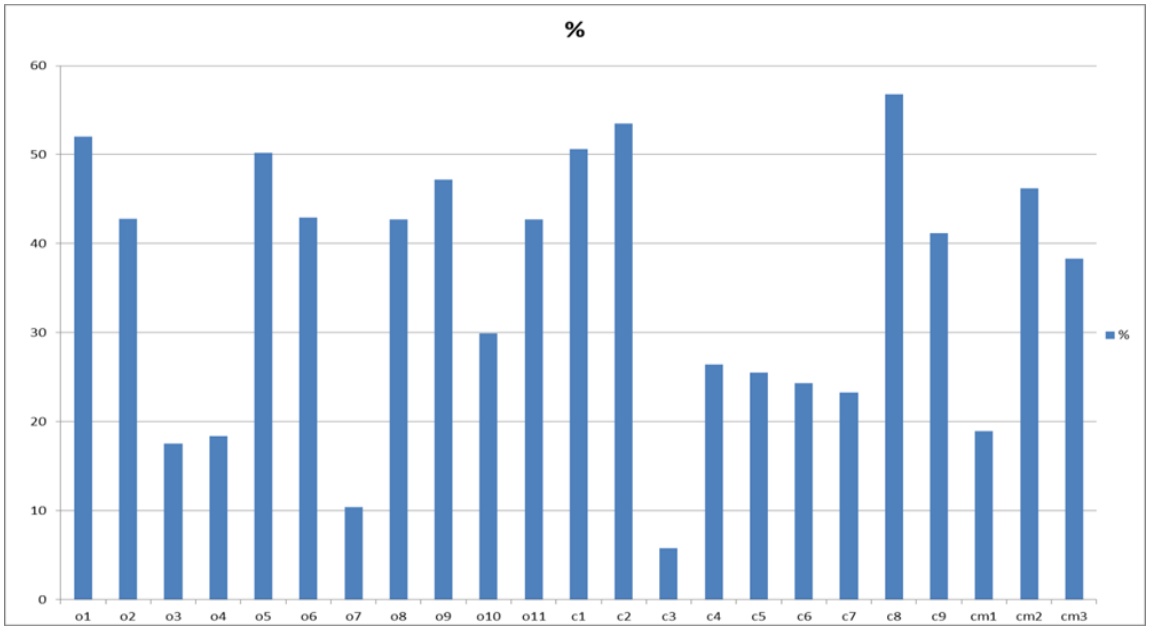


Figure 29: Pourcentage de l'auto agrégation des souches de *S.aureus.*

Les résultats ont montré que : 03/11 souches d'origine ovin, 1/09 souches d'origine caprin et 1/3 souches d'origine chat ont un pourcentage moins de 20%, et concernant les autres souches 08/11 souches d'origine ovin, 08/09 souches d'origine caprin et 02/03 souches d'origine chat présentent une capacité d'auto- agrégation plus de 20%.

Dans notre étude, les isolats des caprins ont présentés un bon pourcentage d'auto- agrégation allant de 20-55% un taux de 88.88%, plus élevés par rapport à les isolats des ovins et des chats.

Nos étude est en supérieur aux études de **(Hua Xuet *al,* 2010),** que ont trouvé le pourcentage de l'auto agrégation des souches *S.aureus* entre (0-10%)**.**

9. La relation entre le biofilm et l'auto-agrégation :

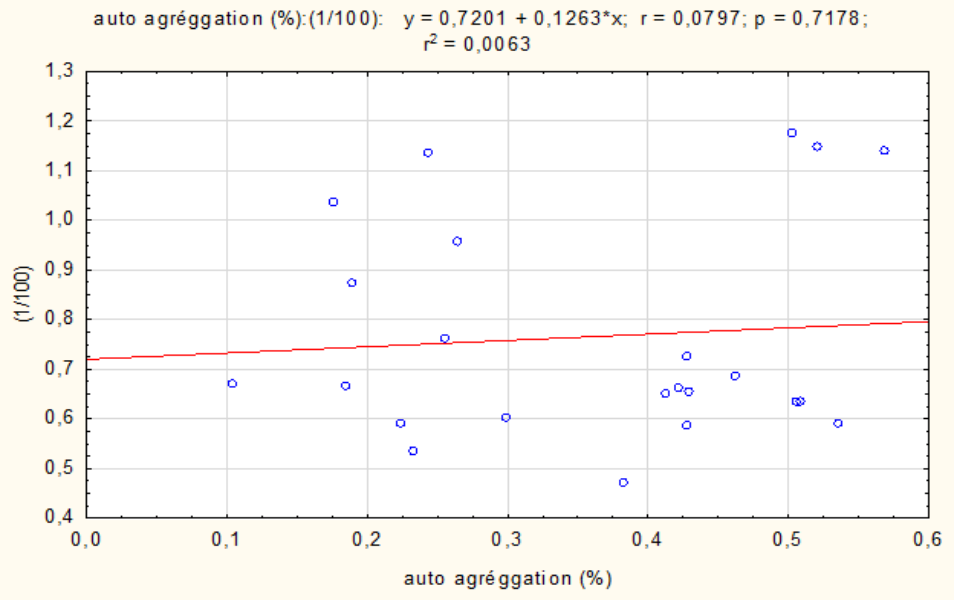


Figure 30 : Corrélation entre le biofilm et auto agrégation des souches *S.aureus.*

Les bactéries se trouvent souvent en consortiums, attachées à des surfaces, des cellules non bactériennes ou d'autres bactéries. L'adhésion bactérie à bactérie des souches génétiquement identiques est appelée auto-agrégation **(El-shama Q. et *al,* 2021)**

La formation de cellules non sessiles et auto-agrégées de *Staphylococcus aureus* contribue à la colonisation de surface et à la formation de biofilm ***(Burel C et al, 2021).***Selon ***(NwokoEQA, et al 2021)*** l'auto-agrégation améliore la formation de biofilm.

En a comparé les résultats obtenus par la technique TCP de formation de biofilm et le test d'auto agrégation par une corrélation statistique on a trouvés aucune corrélation entre les deux test ($p>0.05$), et concernant les souches (o1,o3,o5,c4,c6,c8,cm1)sont des souches forte formatrice de biofilm,et un pourcentage d'auto agrégation allant de 18-55%, pour la plupart des souches étudiés aucune relation n'est trouvé entre auto-agrégation et biofilm ($P>0.05$). **(Song, Y. et *al.* 2019)** ont trouvé qu'aucune relation est observée entre l'auto-agrégation et la formation de biofilm.

La motilité est un facteur important pour la formation de biofilm, alors que l'auto-agrégation ne l'est pas, l'auto-agrégation est moins importante pour la formation de biofilm sur les surfaces horizontales **(El-shama Q. et *al,* 2021).**

Les résultats et discussion

La formation du biofilm est suivie par l'adhésion à la surface, l'auto-agrégation, la fixation via des interactions hydrophobes et la production d'EPS.

L'auto agrégation joue un rôle dans la deuxième étape de formation de biofilm, les étapes de la formation du biofilm : 1) l'étape initiale d'adhésion, de fixation et de formation du biofilm de S. aureus; 2) l'étape de fixation par auto-agrégation et établissement d'interactions hydrophobes ; et 3) l'étape de maturation par production d'EPS **(Yeon Jin Kim et *al*, 2020**)

Conclusion :

Staphylococcus aureus est à la fois un commensal et un agent pathogène chez l'homme et de nombreuses espèces animales, où on le trouve couramment sur la peau et les muqueuses (**Muyiwa et *al,* 2015**). La capacité de *S. aureus* à former du Biofilm est reconnue comme un facteur de virulence important in vivo, ce qui contribue à des infections récidivantes et chroniques résistantes au système immunitaire, ainsi qu'antibiotique.

L'objectif de notre travail été l'étude de la formation de Biofilm chez des souches *S.aureus* d'origine animale, et ceci de faite de l'importance médicale des infections causée par cette bactérie, ainsi le risque pour la santé publiques qui s'ensuit. L'étude de la formation du Biofilm a été réalisée par la technique de plaque de culture 96puis (TCP), c'est une technique semi-quantitative le plus utilisée par les chercheurs de monde entiers pour étudier les Biofilms in vitro. Une exploration de l'effet de déférent inoculum, ainsi que l'effet de NaCl par défèrent concentration (2% et 6%). Une analyse de l'auto agrégation, a été faite chez ces souches, pour étudier ce phénomène important chez les bactéries et qui contribue positivement à la formation de Biofilm chez plusieurs espèces bactriennes, mais chez *S.aureus* il est moins étudié, on a cherché et essayer d'élucider s'il y a une relation entre biofilm-auto aggrégation chez *S.aureus*.

Les résultats de nos expériences ont montré que toutes les 23 souches de *S.aureus* sont formatrices du Biofilm, avec un taux de 30.42% des fortes formatrices de biofilm et 69.43% étaient moyennement formatrices (innoculum 1/100). Nos résultat ont montré que l'ajout de NaCl a différentes concentrations a amélioré la formation de biofilm ($P<0.005$), un pourcentage de 82% et 78.26% des isolats sont fortement formatrice de Biofilm pour des concentrations NaCl 6% et 2% respectivement. Le chlorure de sodium ajouté peut augmenter la formation de biofilm de *S. aureus* en augmentant l'expression des gènes Ica.

Cette étude a permet de déterminer le potentiel de formation du Biofilm par les *S. aureus* par diférent inoculum, on a remarqué que le taux de Biofilm est augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'inoculum ($P<0.00001$). L'inoculum de 0.5Macfarland diluée à 1/100 a formé le plus faible Biofilm, avec un pourcentage de 17.40% des bactéries fortes formatrices, par rapport à l'inoculum de 0.5Macfarland que représente un taux plus élevé 82.61% des souches fortes formatrices.

Conclusion:

Nos résultats montrent que le pourcentage d'auto aggrégation présente un pourcentage de 10-55% chez toutes les souches isolées, et par un test de corrélation on n'a observé qu'aucune relation entre la formation de Biofilm et l'auto aggrégation.

L'antibiogramme est un outil d'aide à la décision thérapeutique. C'est un test de laboratoire qui permet de mesurer la sensibilité ou la résistance bactérienne in vitro. Ce test a révélé une résistance élevés envers la Pénicilline 73.91%, suivie par Tétracycline 30.43%, suivie par Cefoxitine 21.73%, ce qui représente un pourcentage élevé de SARM.

Perspective:

Le biofilm représente une importance médicale majeure, par les problèmes thérapeutiques qu'il peut causer chez l'animal et l'homme. Dans notre étude *S.aureus* isolés des trois espèces animales domestiques ont un pouvoir non négligeable de formation de biofilm, ce qui représente un risque de la santé publique par contact entre l'animal et l'homme.

La lutte et la radication de biofilm sont une nécessite extrême, et ceci par le respect de l'hygiène et développement des nouveaux matériaux et surface abiotique qui empêche la fixation des bactéries et la formation de biofilm, surtout pour les dispositifs médicale comme des sondes médicale, et les machines à traire. Au même temps développer des infections et des médicaments qui pénètrent et détruis le biofilm.

Listes des references

A

- Al Alam, D., 2008. Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales bronchiques et staphylococcus aureus sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Reims.
- Allison D. G, Gilbert P, Lappin-Scott H. M and Wilson M (2000) Community structure and co-operation in biofilms. Society for General Microbiology. New York: Cambridge University Press, 59 Symposium. ISBN-10: 0521793025
- Ahmer, B.M.M. 2004 ,Le processus de communication chimique implique la production, la détection et la réaction à de minuscules composés de type hormonal appelés auto-inducteurs (AI 2007 Christopher, M-W., Bassler, B. 2007. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology.21, 319-46.
- Ahmer, B.M.M. 2004.Cell-to cell signaling in Eschericia coli and Salmonella enterica.Molecular Microbiology. 52, 933-945 ,Le processus de communication chimique implique la production, la détection et la réaction à de minuscules composés de type hormonal appelés auto-inducteurs
- (AI) 2007 Christopher, M-W., Bassler, B. 2007. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology.21, 319-46.
- Arce Miranda JE, Sotomayor CE, Albesa I, et al. Stress oxydatif et nitrosatif dans le biofilm de Staphylococcus aureus. FEMS MicrobiolLett 2011 ; 315(1) : 2329
- Alnnasouri, M. 2010. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

B

- Bourgeois,C., Mescle, J., Zucca, J., 1996. Microbiologie alimentaire: tome 1-Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. tome 2-Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc Lavoisier
- Baird-Parker, A., 1965. Staphylococci and their classification. Annals of the New York Academy of Sciences128, 4-25.

Listes des references

- Bannerman, T.L., 2007. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci.Manual of clinical microbiology, 390-411.
- Bisognano, C., 2001. Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de" Staphylococcus aureus": étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. University of Geneva.
- Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins.International journal of food microbiology61, 1-10.
- Bailey, C.J., Lockhart, B.P., Redpath, M.B., Smith, T.P., 1995. The epidermolytic (exfoliative) toxins of Staphylococcus aureus.Medical microbiology and immunology184, 53-61.
- Behlou, I., Gilmore, M.S. 2008. Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases.Archives of Ophthalmology. 126, 1572-1581.
- Branger, A., Richer, M.M., Roustel, S. 2007. Quelque système microbien : les biofilms.Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon,131-164.
- Bellifa, S. 2014. Evaluation de la formation du biofilm des souches de Klebsiella Pneumoniae isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat.Université abou bekr belkaid, Tlemcen.
- Bezoui M. (2016). Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Thèse de master : Pharmacie. Rabat : Université Mohammed V- Rabat. P 110.
- Alnnasouri, M. 2010. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Berche, P., Gaillard, J.-L., Simonet, M., Simonet, M., 1988.Bactériologie: bactéries des infections humaines. Flammarion médecine-sciences.
- Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., Kodjikian, L., 2010. Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. Journal Français d'Ophtalmologie33, 210-221.
- Boutaleb, N., 2007. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Lorient.
- Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., Kodjikian, L., 2010.Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementales, des propriétés

Listes des references

bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. Journal Français d'Ophtalmologie33, 210-221.

- Bjorklof, K., Nurmiaho-Lassila, E.L., Klinger, N., Haahtela, K., Romantschuk, M. 2000. Colonization strategies and conjugal gene transfer of inoculated Pseudomonas syringae on the leaf surface. Journal of Applied Microbiology.89, 423-432.;
- Beloin C, Houry A, Froment M, et al. (2008) A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. PLoS Biol 6: e167.]. Ceci est parfois appelé co-Adhérence
- Bos R, Mei HCVD, Busscher HJ (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiol Rev 23: 179–230
- BlantonL , V , Wang , LT , Hofmann , J , Dubow , J , Lafrance , UN. , Kwak , S et al (2018) *L'adhérence agrégative et la colonisation intestinale par Escherichia coli* entéroagrégatif sont produites par des interactions entre plusieurs facteurs de surface . *msphère* 3 , e00078-18
- Bhargava , S , Johnson , BB , Hwang , J , Harris , AT , George , COMME , Muir , UN. et al(2009) L'agglutinin1thermorésistante est un facteur accessoire de colonisation *d'Escherichia coli entéroaggrégatif*. *J. Bactériol.* 191 , 4934 – 4942.
- Bhunia A. K. Staphylococcus aureus. In: Bhunia A. K., editor. *Foodborne Microbial Pathogens.* Springer; NY: (2008). pp. 125–134.

C

- Corigan, R.M., Miajlovic, H., Foster, T.J. 2009. BMC Microbiology Article number: 22, Surface proteins That promote adherence of Staphylococcus aureus human des quamated nasal epithelial cells.
- Chevalier, C., 2009. Fonctions et mécanismes d'action de l'ARNIII et de nouveaux ARN non codants de Staphylococcus aureus. Strasbourg.
- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K. T., & Herrmann, M. (2005).Staphylococcus aureus interactions with the endothelium.Thrombosis and haemostasis, 94(08), 278-285.
- Costerton J W., Dolan R M. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev; 15: 167-193

Listes des references

- Characklis WG , McFeters GA , Marshall KC . Écologie physiologique dans les systèmes de biofilm. Dans : Characklis WG, Marshall KC, éditeurs. Biofilms. New York : John Wiley & Sons ; 1990 . p. 341–94.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., Buret, A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. Journal of Clinical Microbiology. 37, 1771-1776.
- Chalvet de Rochermonteix A. (2009). Les Biofilms et peaux. Thèse de Doctorat vétérinaire :Faculté de médecine de Créteil. Paris Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort. P147.
- Cramton SE, Ulrich M, Gotz F, et al. Les conditions anaérobies induisent l'expression de l'adhésineintercellulaire polysaccharidique chez Staphylococcus aureus et Staphylococcus epidermidis. Infect Immun 2001; 69(6): 4079–4085
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, et al. Le locus d'adhérence intercellulaire (ica) est présent chez Staphylococcus aureus et est nécessaire à la formation de biofilm. Infect Immun 1999; 67(10): 5427–5433.
- Céline Burel1, Rémi Dreyfus1 & Laura Purevdorj‑Gage2.2021 .Physical mechanisms driving the reversible aggregation of *Staphylococcus aureus* and response to antimicrobials scientific reports
- Cordero , BŒUF et Données , PS (2016) Interactions microbiennes et assemblage communautaire à micro-échelle . *Courant. Avis. Microbiol.* 31 , 227 – 234
- Couvigny , B , Kulakauskas , S , Pons , N , Quinquis , B , Abraham , AL. , Meylheuc , T et al (2018) Identification de nouveaux facteurs modulant les capacités d'adhésion de la bactérie commensale pionnière *Streptococcus salivarius* . *Devant. Microbiol.* 9 , 273
- Cengiz, S., Okur, S., Oz, C., Turgut, F., Gumurcinler, B., Sevuk, N. S., Kekec, A. I., Cepoglu, H., Sevimli, U., & Adiguzel, M. C. (2023). Prevalence and clonal diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius isolated from dogs and cats with eye discharge, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* (published online ahead of print 2023).
- CATHERINE HARRISON-BALESTRA, MD,n ALEJANDRO L. CAZZANIGA, BS,w STEPHEN C. DAVIS,BS,w AND PATRICIA M. MERTZ, Baw A Wound-Isolated Pseudomonas aeruginosa Grows aBiofilm In Vitro Within 10 Hours and Is Visualized by Light Microscopy University of Miami School of Medicine, and Department of Dermatology and Cutaneous Surgery,

Listes des references

Miami, Florida 2003 by the American Society for Dermatologic Surgery, Inc. Published by Blackwell Publishing, Dermatol Surg 2003;29:631–635

D

- DESCOTEAUX, L. 2004. La mammite clinique: stratégies d'intervention. In: Symposium sur les bovins laitiers.
- Davey ME., and O'Toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* ; 64 : 847–867.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002 Sep;8(9):881-90
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews15, 167-193.
- Drago, L.,Toscano, M. 2017. Biofilm Formation and the Biological Response, Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs), 25-39
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002 Sep;8(9):881-90
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews15, 167-193
- Djelloul Daouadji S. (2010). Détection de biofilm a staphylocoques sur cathéters veineux.Mémoire de Magister : Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen
- Dong , Y. , Li , S , Zhao , D. , Liu , J , Maman , S , Geng , J et al (2020) Iolr, un régulateur négatif de la voie métabolique du myo-inositol, inhibe l'auto-agrégation cellulaire et la formation de biofilm en régulant à la baisse RpmA chez *Aeromonas hydrophila* . *NPJ Biofilms Microbiomes* 6 , 22.
- Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:1569–1573

E

Listes des references

- El-shama QA Nwoko Iruka N.Okeke Autoagrégation des bactéries : comment et pourquoi les bactéries s'agglutinentBiochem Soc Trans (2021) 49 (3): 1147–1157.

F

- Fomba, 2006. Role pathogéne et sensibilité aux antibiotique des acinitobacter baumani et staphylocoque à coagulase négative a l'hopitale du point G thése de doctorat :Faculté de médcine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie. 95.
- Foster, T. J., & Höök, M. (1998).Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends in microbiology, 6(12), 484-488.
- Filloux A, Vallet I (2003) Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. M/S : médecine sciences, 19: 77-83.
- FLEMMING et WINGENDER, 2010.
- Fletcher M, Loeb GI. Influence des caractéristiques du substrat sur l'attachement d'une pseudomonade marine aux surfaces solides. Appl Environ Microbiol . 1979; 37 : 67–72.
- Fletcher M, Loeb GI. Influence des caractéristiques du substrat sur l'attachement d'une pseudomonade marine aux surfaces solides. Appl Environ Microbiol . 1979; 37 : 67–72)
- Fomba, 2006. Role pathogéne et sensibilité aux antibiotique des acinitobacter baumani et staphylocoque à coagulase négative a l'hopitale du point G thése de doctorat :Faculté de médcine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie. 95.
- Fiche technique bactériologie1973

G

- Graille, M., Stura, E. A., Corper, A. L., Sutton, B. J., Taussig, M. J., Charbonnier, J. B., & Silverman, G. J. (2000).Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein a domaincomplexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(10), 5399-5404
- Gillespie, S., & Hawkey, P. M. (Eds.).(2006). Principles and practice of clinical bacteriology.John Wiley & Sons.
- Guillaume, V. (2014). Diversité génétique des isolats de Staphylococcus aureus producteurs de toxine de pantone-Valentine isolés au chu de Toulouse. Étude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse, France, p107

Listes des references

- Ghigo, J.M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature. 412, 442-445.)
- Giaouris , E. , Héritier , E. , Desvaux , M , Hébraud , M , Møretrø , J ,Langsrud , S et al (2015) Interactions intra- et inter-espèces au sein des biofilms d'importants pathogènes bactériens d'origine alimentaire . *Devant. Microbiol.* 6 , 841
- Gavin, K., Paterson., Ewan, M., Harrison., Mark, A., Holmes. 2014. The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vol.22. p-42.
- Goetz, C., Dufour, S.,Archambault, M., Malouin, F., Jacques, M., 2016. Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière: une revue bibliographique.
- Grünfeld, J.-P., 1994. Dictionnaire de médecine Flammarion. Médecine-Sciences.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.-H., 2006.The genera staphylococcus and macrococcus. The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria,5-5 .

H

- Hennekinne, J., 2009. Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive. Thse Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de lEnvironnement, Agro Paris Tech. 183p.
- Høiby N., Ciofu O., Johansen H K., Song Z J., Moser C., Jensen P., and Bjarnsholt T.(2011). The clinical impact of bacterial biofilms‖. International Journal of Oral Sciences; 3 (2): 55-65.
- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus Candida albicans is mediated by farnesol. Applied and Environmental Microbiology.67(7), 2982- 2992.)
- Hua Xu, Yunyun Zou, Hyeon-Yong Lee et Juhee Ahn Effet du NaCl sur la formation de biofilm par Agents pathogènes d'origine alimentaire Vol. 75, Nr. 9, 2010 Journal des sciences alimentaire.
- Hennekinne, J., 2009. Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive. Thse Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. 183p.
- Hawkey, P.M., 2006. Proteus, providencia and Morganella spp. Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 391-396

Listes des references

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

I

- Irie, Y., Parsek, M. 2008. Quorum sensing and microbial biofilm, Current topics in microbiology and immunology. 322, 67-84.

J

- Jacobsen S M., Stickler D J., Mobley M L., & shitiliff M E. (2008).Complicated Catheterassocited urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*.Clin Microbiol Rev.; 21: 26-59.
- Joshi LR, A Tiwari, SP Devkota, S Khatiwada, S Paudyal and KR Pande, 2014. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in dairy farms of Pokhara, Nepal.Inter J VetSci, 3(2): 87-90.
- Jakubovics , N.-É. (2015) Les interactions intermicrobiennes comme moteur de la composition de la communauté et de la stratification des biofilms oraux . *J. Mol. Biol.* 427 , 3662 – 3675
- Jin Kim, Hwan Hee Yu, Yeong Jin Park, Na-Kyoung Lee et Hyun-Dong Paik. Activité anti-biofilm du surnageant acellulaire de Saccharomyces cerevisiae contre Staphylococcus aureu. J. Microbiol. Biotechnol.2020 ; 30(12): 1854-1861
- JP. Flandrois. Bactériologie Médicale. Coll Azay. Puf. 2000.

K

- Knobloch, J.K.-M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.-H., Mack, D., 2001.Biofilm formation by Staphylococcus epidermidis depends on functional RsbU, an activator of thesigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. Journal of bacteriology183, 2624-2633
- Khalil MA et Sonbol FI. Enquête sur la formation de biofilms sur les lentilles de contact causées par Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline. Niger J Clin Pract 2014; 17(6) : 776–784.

Listes des references

- Kragh KN, Hutchison JB, Melaugh G, et al. (2016) Role of multicellular aggregates in biofilm formation. MBio 7: e00237-16
- Kennouche , P , Charles Orszag , ONU. , Nishiguchi , D. , Goussard , S , Imhaus , ONU F. , Dupré , M et al (2019) Une analyse mutationnelle profonde de la piline majeure de *Neisseria meningitidis* révèle l'importance de l'adhésion médiée par la pointe du pilus . *EBO J.* 38 , e102145
- Katharios-Lanwermeyer , S , Xi , C , Jakubovics , N.-É. et Rickard , Ah (2014) Mini-revue : coagrégation microbienne : ubiquité et implications pour le développement du biofilm . *Encrassement biologique* 30 , 1235 1251
- Kennouche , P , Charles Orszag , ONU. , Nishiguchi , D. , Goussard , S , Imhaus , ONU F. , Dupré , M et al (2019) Une analyse mutationnelle profonde de la piline majeure de *Neisseria meningitidis* révèle l'importance de l'adhésion médiée par la pointe du pilus . *EBO J.* 38 , e102145
- Kodjikian, L., Roques, C., Campanac, C., Doleans, A., Baillif, S., Pellon, G., Renaud, F., Hartmann, D., Freney, J., Burillon, C., 2005.Biofilms à Staphylococcus epidermidis à la surface des implants intraoculaires. Journal français d'ophtalmologie28, 224-230.
- Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H. 1997. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol. Rev. 10. 505-520.

L

- Lowy, F. D. (1998) .Staphylococcus aureus infections.New England journal of medicine, 339(8), 520-532.. ;.. Chambeaud, F. (2012). Les staphylocoques en pathologie cutanee chez le chien connaissances actuelles. Thèse de doctorat. Université Claude-Bernard – Lyon I, France.p112.
- Lister, J. L., Horswill, A. R. (2014).Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *4*, 178.
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R., 2010. Biofilms. Cold Spring Harbor perspectives in biology2, a000398
- Luther MK, Bilida S, Mermel LA, et al. L'exposition à l'éthanol et à l'alcoolisopropylique augmente la formation de biofilm dans le staphylococcus aureus et le staphylococcus epidermidis. Infect Dis Ther 2015 ; 4(2): 219–22

Listes des references

- Li , D. , Liang , X. et Wu , C (2020) Caractéristiques de l'élimination de l'azote et des substances polymères extracellulaires d'une nouvelle bactérie dénitrifiante tolérante au sel, *Pseudomonas* sp. DN-23 . *Devant. Microbiol.* 11 , 335
- Lin Chen , Zi-Yun Tang ,Shi-Yun Cui , Zhen-Bao Ma,, Hua Deng , Wei-Li Kong , Li-Wen Yang , Chao Lin ,Wen-Guang Xiong 1,and Zhen-Ling Zeng ,Biofilm Production Ability, Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in Staphylococcus aureus from Various Veterinary Hospitals Published: 4 April 2020
- LE LOIR Y, GAUTIER M. (2010) Staphylococcus aureus. Tec & Doc, EMinter, Lavoisier. France.
- Le Minor, L., & Veron, M (1990). Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus» J.Fleurette, 2, 773-794.
- LE MINOR L et VERON M. 1982. « Bactériologie Médicale », 1ère édition, Flammarion, Paris

M

- Muyiwa, A.A., Kumar, A., Ateba, C.N. 2015.Genetic characterization of antibioticresistant Staphylococcus aureus from milk in the North-West Province, South Africa.Saudi Journal of Biological Sciences.25(7).1348-1355.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R.,Brusetti, L., Andrighetto, C., Lombardi, A.2010. Research in Veterinary Science : Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA(RAPD) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing Staphylococcus aureus isolated from dairy products. 88(3).427-35.
- Mittelman, M.W., 1996. Adhesion to biomaterials. Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity. New York: Wiley-Liss, Inc, 89_127.
- Martinez, L.R., Casadevall, A., 2007. Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. Appl. Environ. Microbiol.73, 4592-4601.
- Melaugh G, Hutchison J, Kragh KN, et al. (2016) Shaping the growth behaviour of biofilms initiated from bacterial aggregates. PLoS One 11: e0149683.
- Miljkovic , M , Marinovic , P , Novovic , K , Jovcić , B , Terzic-Vidojevic , UN. et Kojic , M (2018) Agglr, un nouveau facteur d'agrégation

Listes des references

chez *Lactococcus raffinolactis* BGTRK10-1 : son rôle dans l'adhésion de surface . *Encrassement biologique* 34 , 685 – 698

- Morris DO, Mauldin EA, O'Shea K, Shofer FS, Rankin SC. Clinical, microbiological, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of cats. *Am J Vet Res.* 2006;67:1421–1425.

N

- Nasser, W., Reverchon, S. 2007. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators.Analytical and bioanalytical chemistry.387(2), 381-390; Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Sari-Belkharroubi, L., Boucherit, K. 2016).Risque infectieux liéà la formation des biofilms multi-espèces (Candida- bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. Journale de Mycologie Médicale. 27, 20-27.

P

- Pecastaings S. (2010). Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat : Université de Toulouse
- Peton V, Le Loir Y. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. Infect Genet Evol. 2014 Jan;21:602-15.
- Pellerin JL, Gautier M, Le Loir Y (2010). Identification de l'espèce au sein du genre.Monographies de Microbiologie. In Larpent JP, le Loir Y, Gautier M. Staphylococcus aureus. Editions Tec & Doc. Paris : Lavoisi er, p. 1-20.

Q

- Queck S-Y., Weitere M., Moreno AM *et al*. (2006). The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of Serratia marcescens biofilms againstprotozoan grazing. *Environ. Microbiol.* ; 8 : 1017- 1025

O

- Otto, M. (2008).Staphylococcal biofilms.In Bacterial biofilms (pp. 207-228).Springer, Berlin, Heidelberg.

Listes des references

- O'Toole G.A, Kaplan H.B, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development.Annu. Rev. Microbilogy, 54: 49-79.
- O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Mol Microbiol 30: 295–304

R

- Rumbaugh, K.P.,ET Sauer, K.(2020). Biofilm dispersion.Nature Reviews Microbiology.Doi :10.1038/s41579-020-0385-0.
- Roux A., Ghigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens présenté par communication. Bull. Acad. Vét. France – Tome; 159 (3) 261-268.
- Roux A., Ghigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens présenté par communication. Bull. Acad. Vét. France – Tome; 159 (3) 261-268) .Il peut être composé de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations
- Ross, J.F. 2010. La réponse au farnésol de Candida albicans: production de biofilms et parenté génétique. Mémoire de Maîtrise en Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal
- Roux, A., Chigo, J.M. 2006. Les biofilms bactériens. Communication. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France. 3, 262-266
- Rich M, Roberts L. MRSA in companion animals. *Vet Rec.* 2006;159:535–536
- Rémy, D., 2010. Les mammites. France AgricoleÉditions.

S

- Schaechter M., Medoff G., et Eisenstein B I. (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Supérieur.
- Sutherland I.W (2001) The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology, 9: 222-227. DOI: 10.1016/s0966 842x(01)02012-1.
- Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation.Molecular Microbiology. 52, 917-924.

Listes des references

- Shapiro, J.A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms.Annual Review of Microbiology. 52, 81-104.
- (Stewart, P.S., Costerton, J.W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.Lancet. 358,135-138.).
- Schauder S., Shokat K., Surette M G., and Bassler B L. (2001).The LuxS family ofbacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule.*Microbiol*; 41:463-76.
- Singh AK, Prakash P, Achra A, et al. Normalisation et classification de la formation de biofilms in vitro par des isolats cliniques de staphylococcus aureus. J Glob Infect Dis 2017 ; 9(3): 93–101.
- Selvaraj , UN. , Jayasree , T , Valliammai , UN. et Pandien , Sask. (2019) Le myrtenol atténue le biofilm et la virulence du SARM en supprimant le dynamisme de l'expression de sarA . *Devant. Microbiol.*
- Sambanthamoorthy K., Schwartz A., Nagarajan V., Elasri M. O. The role of msa in Staphylococcus aureus biofilm formation. *BMC Microbiol.* (2008);8:221. doi: 10.1186/1471-2180-8-221.
- Smith J. L., Benedict R. C., Palumbo S. A. Protection against heat-injury in Staphylococcus aureus by solutes. *J. Food Prot.* (1982);45:54.
- Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A., Failing, K., 2003.The epidemiology of Staphylococcus aureus infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme.Veterinary microbiology96, 91-102.
- Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 2001;147:3–9.

T

- Tremblay YD, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique [Bacterial biofilms: their importance in animal health

Listes des references

and public health]. Can J Vet Res. 2014 Apr;78(2):110-6. French. PMID: 24688172; PMCID: PMC3962273.

- Tomlin., Mallot RG. (2005). Quorum-sensing mutations affect attachment and stabilityof Burkholderi cenocepacia biofilms.*Appl. Environ. Microbial*. ; 5208- 5218
- Tronc , J , Khalil , SH et Leo , JC (2018) Autoagrégation bactérienne . *AIMS Microbiol.* 4 , 140 – 164 6 Cai , YM (2020) Agrégats bactériens

V

- Valle J, ToledoArana A, Berasain C, et al. SarA et non sigmaB est essentiel pour le développement du biofilm par Staphylococcus aureus. Mol Microbiol 2003; 48 : 1075–1087
- Vazquez Sanchez D, Habimana O et Holck A. Impact des facteurs environnementaux liés à l'alimentation sur l'adhérence et la formation de biofilm d'isolats naturels de Staphylococcus aureus. CurrMicrobiol 2013 ; 66(2): 110–121.
- Vincent Peton ,Yves Le Loir. Staphylococcus aureus in veterinary medicine.
- Fasquelle, R., 1974. Eléments de bactériologie médicale. Flammarion.

W

- Waters, C.M., Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing : cell-to-cell communication in bacteria. Annual review of cell and developmental biology. 21, 319-346. ; Abraham, W. R. 2006. Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria.Current Medicinal Chemistry. 13, 1509-1524.
- Weese, J.S.; Dick, H.; Willey, B.M.; McGeer, A.; Kreiswirth, B.N.; Innis, B.; Low, D.E. Suspected transmissionof methicillin-resistant Staphylococcus aureus between domestic pets and humans in veterinary clinics and inthe household. Vet. Microbiol. 2006, 115, 148–155.
- Winans S, C., Bassler, B.L. 2002. Mob psychology.Journal of bacteriology. 184(4), 873-883 Waters, C.M., Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing : cell-to-cell communication in bacteria. Annual review of cell and developmental biology. 21, 319-346.

Listes des references

Y

- Yannick D N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Can. J. Veterinary. Res.; 78:110- 116.
- Yeon Jin Kim, Hwan Hee Yu, Yeong Jin Park, Na-Kyoung Lee et Hyun-Dong Paik. Activité anti-biofilm du surnageant acellulaire de Saccharomyces cerevisiae contre Staphylococcus aureu. J. Microbiol. Biotechnol. 2020 ; 30(12): 1854-1861

Z

- Zhang, W.J.; Hao, Z.H.; Wang, Y.; Cao, X.Y.; Logue, C.M.; Wang, B.; Yang, J.; Shen, J.Z.; Wu, C.M. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from pet animals and veterinary staff inChina. Vet. J. 2011, 190, e125–e129.

Annexe 01 ; Matériel de laboratoire

Équipements

- Etuve microbiologique.
- Bec Bunsen
- Balance électronique.
- Spectrophotomètre.
- Réfrigérateur.
- Vortex.
- Bain-marie.
- Autoclave.
- Gants
- Glacière

Verrerie et outils :

-boites de Pétri.

-tubes à essai.

- pipettes Pasteur
- écouvillons
- tubes à hémolyse
- anse à boucle

-micropipette (200 µL)

- spatules.
- cuves de spectrophotomètre
- flacons en verre
- pince bactériologique
- Portoirs
- Lame en verre.

Milieux de culture :

- Gélose Muller-Hinton.
- Gélose à ADN.
- Eau physiologique stérile

- Eau distillée stérile
- Disques d'antibiotiques
- Gélose a Chapman
- Gélose nutritif
- Bouillon BHIB
- Bouillon PBS
- Gélose au sang

Annexe 02: Composition chimique des milieux de culture et de solutions Milieux de culture

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 d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C

Gélose Columbia au sang du mouton :

Composition :

Mélange spéciale de peptones…..… 23.0 g

Amidon…….…… 1.0g

Chlorure de sodium…… 5.0 g

Agar…… 0.7 g

pH = 7.3

Préparation : 42.5 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20 min

Gélose nutritive :

Composition :

Peptone……..10.0g

Extrait de viande…… 5g

Chlorure de sodium…….. 5g

Agar ….. …… 10.0g

pH=7.3

Préparation : 28g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C

Gélose Mueller-Hinton Composition :

Infusion de viande de bœuf…….. 300 ml

Peptone de caséine……17.5 g

Amidon de maïs…….. 1.5 g

Agar……10.0 g

pH=7,4 ± 0,1

Préparation : 37 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 116°C, 15 min

Gélose DNA

La gélose à l'acide désoxyribonucléique est un milieu solide qui permet la recherche de la désoxyribonucléase des bactéries et particulièrement celle des staphylocoques.

Composition :

Hydrolysat trypsine de caséine…… 20g/L

ADN…….. 2g/L

Chlorure de sodium…….. 5g/L

Agar ……..12g/L

Préparation

Pour préparer cette gélose il faut : mettre 39g de poudre dans un litre d'eau distillée porter à ébullition– jusqu'à dissolution complète ; stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15minutes.

Bouillon cœur-cervelle (BHIB) :

Composition :

Infusion de cervelle de veau……..12.5g

Infusion de cœur de bœuf……..5.0g

Peptone……10.0g

Glucose……..2.0g

Chlorure de sodium……..2.0g

Phosphatase di sodique……5g

pH= 7.4

Préparation : 38g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 15min

Solutions

Cristal violet (0.5%)

Cristal violet …….. 0.5 g

Eau distillée…… 100 ml

Le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)

Na2HPO4…….. 7mM

NaH2PO4……..3mM

NaCl……130mM

pH=7.4

ANNEXES 2 : Composition des réactifs

Eau oxygénée

Eau oxygénée 30%..... 10 g
Eau distillée……90mL

Violet de Gentiane

- Violet de Gentiane en poudre……. 1g

– Phénol……. 2g

– Alcool absolu…… 10m

Annexe II : tableau de lecture antibiotique

Table de lecture 36*: Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus sp*

Antibiotiques testés	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			
		R	I	S	R	I	S	
Pénicilline	10UI	≤28	-	≥29	≥0,25	-	≤0,12	Le test de la ß-lactamase confirme les Interprétation valable pour toutes les pé ticarcilline, pipéracilline)
Pénicilline+Novobiocine	10UI/30 µg	≤14	15-17	≥18	≥4/9	2/4	≤1/2	Traitement des mammites pendant la
Oxacilline (S.aureus et S.lugdunensis)		----	----	----	≥4	----	≤2	Tester le disque de céfoxitine 30 µg p
Céfoxitine (S.aureus) ***	30 µg	≤21	----	≥22	≥8	----	≤4	staphylocoques à coagulase négative
Oxacilline (S.C.N sauf S.lugdunensis)	---	---	---	---	≥0,5	---	≤ 0,25	La résistance à la céfoxitine signifie la Le disque d'oxacilline n'est pas fia
Céfoxitine (S.C.N sauf S.lugdunensis)***	30 µg	24	---	25	---	---	---	résistance à la méticilline de S.aureu
Gentamicine**	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4	Les souches résistantes à la gentam streptomycine **
Néomycine/ Kanamycine	30 µg	≤13	14-17	≥18	≥64	32	≤16	La réponse pour la néomycine est va
Vancomycine (S.aureus)	---	---	--	---	≥16	4-8	≤2	Le disque de vancomycine ne permet p *Staphylococcus aureus*, ni de différenci
Vancomycine (S.C.N)	---	---	---	---	≥16	4-8	≤2	diamètres d'inhibition sont similaires. L
Erythromycine	15 µg	≤13	14-22	≥23	≥8	1-4	≤0,5	Détecter la résistance inductible en
Clindamycine	2 µg	≤14	15-20	≥21	≥4	1-2	≤0,5	clindamycine. En présence d'une im clindamycine
Enrofloxacine	5 µg	≤16	17-22	≥23	≥4	1-2	≤0,5	
Sulfisoxazole	250 ou 300 µg	≤12	13-16	≥17	≥512	-	≤256	La réponse pour le sulfisoxazole es
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤10	11-15	≥16	≥4/76	-	≤2/38	-Valable pour Triméthoprime/ Sulfadi -La valeur ≤2/38 peut être utilisée pou
Tétracyclines	30 µg	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤4	Les souches sensibles à la tétracycline
Bacitracine	130 µg	<15	-	≥15	≥2	-	<2	

*Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved standard –Third
** Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiosurveillance
*** Antibiotique testé seulement pour lamise en évidence de la résistance à la méticilline. Le CLSI recommande dans son communiqué de fé

ANNEXE III : Résultats d'antibiogramme détaillés par souche chez les ovins et chez les caprins et le chat

DISC/SOUCHES	P 10µg	FOX 30µg	CIP 5µG	TE 30µg	GN 10µg	AK 30µg	CD 2µg	BA 10µg	COT 25µg	E 15µg
CM1	6/R	22/S	30/S	25/S	27/S	25/S	21/S	10/R	30/S	19/S
Cm2	6/R	6/R	30/S	21/S	28/S	20/S	26/S	26/S	20/S	20/S
Cm3	6/R	6/R	34/S	20/S	28/S	25/S	20/S	20/S	25/S	25/S
C1	44/S	32/S	37/S	20/S	30/S	25/S	30/S	20/S	30/S	34/S
C2	22/R	26/S	32/S	25/S	30/S	28/S	30/S	16/S	30/S	30/S
C3	45/S	40/S	36/S	14/R	25/S	24/S	26/S	16/S	34/S	35/S
C4	16/R	30/S	36/S	30/S	32/S	30/S	32/S	28/S	33/S	34/S
C5	40/S	33/S	34/S	14/R	24/S	22/S	28/S	22/S	32/S	32/S
C6	48/S	32/S	36/S	12/R	28/S	25/S	34/S	28/S	35/S	38/S
C7	48/S	28/S	32/S	13/R	24/S	26/S	27/S	17/S	30/S	21/I
C8	6/R	6/R	30/S	30/S	25/S	30/S	16/I	22/S	25/S	33/S
C9	6/R	20/R	30/S	28/S	23/S	24/S	28/S	18/S	25/S	30/S
O1	15/R	26/S	36/S	16/I	24/S	23/S	24/S	14/R	29/S	28/S
O2	20/R	29/S	30/S	24/S	22/S	23/S	26/S	18/S	28/S	29/S
O3	11/R	31/S	32/S	14/R	22/S	22/S	22/S	14/R	28/S	26/S
O4	18/R	30/S	34/S	11/R	23/S	24/S	22/S	18/S	27/S	29/S
O5	20/R	32/S	33/S	17/I	23/S	25/S	20/S	22/S	31/S	30/S
O6	18/R	30/S	36/S	10/R	24/S	22/S	26/S	22/S	30/S	27/S
O7	11/R	31/S	38/S	32/S	25/S	26/S	26/S	20/S	32/S	30/S
O8	19/R	26/S	32/S	27/S	30/S	28/S	10/S	20/S	38/S	33/S

O9	40/S	30/S	34/S	30/S	23/S	24/S	16/S	18/S	30/S	32/S
O10	10/R	6/R	25/S	25/S	20/S	25/S	20/S	6/R	25/S	29/S
O11	14/R	20/S	30/S	28/S	23/S	23/S	26/S	20/S	29/S	28/S

Tableau : Des DO de formation de biofilm des souches S. aureus par déférente inoculum

Les Souche	Delution1/100	Biofilm de 0.5 MaCfarland	Biofilm de 0.5 MaCfarland avec dilution
O1	1,147±0.361	0.979 ±0.082	0.655±0.105
O2	0,588±0.069	1.132±0.144	0.488±0.063
O3	1,037±0.441	1.231±0.319	0.496±0.038
O4	0,667±0.085	0.664±0.124	0.526±0.094
O5	1,178±0.593	1.575±0.405	0.571±0.128
O6	0,654±0.027	1.328±0.132	0.510±0.008
O7	0,672±0.019	1.42±0.132	0.595±0.152
O8	0,725±0.124	1.528±0.180	0.643±0.111
O9	0,663±0.081	1.565±0.234	0.681±0.074
O10	0,601±0.060	2.369±0.123	0.773±0.094
O11	0,590±0.512	1.209±0.150	0.934±0.102
C1	0,636 ± 0.128	1.636±0.215	0.641±0.134
C2	0,593±0.029	1.689±0.519	0.729±0.148
C3	0,636±0.128	1.031±0.229	0.577±0.141
C4	0,956±0.043	1.223±0.214	0.651±0.135
C5	0,761±0.148	3.840±0.310	0.524±0.042
C5	*1,138*±0.043	1.279±0.335	0.878±0.207
C7	0,536±0.124	2.350±0.536	0.430±0.052
C8	1,142±0.211	1.344±0.318	0.827±0.189
C9	0,650±0.124	2.45±0.518	0.700±0.125
CM1	0,872±0.128	1.645±0.392	0.767±0.047
CM2	0,686±0.2	2.975±0.295	0.703±0.162
CM3	0,470±0.019	3.108±0.243	0.758±0.09

Tableau : Des DO de formation de biofilm des souches S. aureus par déférente concentrations de Na Cl.

Les Souche	Dilution1/100	Biofilm avec 2%Nacl	Biofilm avec 6%Nacl
O1	1,147±0.361	0.791±0.101	0.684±0.078
O2	0,588±0.069	0.700±0.134	0.837±0.111
O3	1,037±0.441	0.749±0.149	0.917±0.141
O4	0,667±0.085	0.682±0.158	1.159±0.229
O5	1,178±0.593	0.582±0.095	1.214±0.090
O6	0,654±0.027	0.818±0.232	1.521±0.372
O7	0,672±0.019	0.656±0.037	1.232±0.080
O8	0,725±0.124	0.628±0.04	1.300±0.137
O9	0,663±0.081	0.767±0.023	1.354±0.102
O10	0,601±0.060	0.849±0.157	1.193±0.158
O11	0,590±0.512	0.945±0.095	1.322±0.036
C1	0,636 ± 0.128	0.833±0.252	1.006±0.179
C2	0,593±0.029	1.468±0.517	1.415±0.202
C3	0,636±0.128	0.992±0.109	1.266±0.154
C4	0,956±0.043	1.497±0.49	1.102±0.107
C5	0,761±0.148	0.842±0.060	0.968±0.169
C5	*1,138*±0.043	1.497±0.49	0.863±0.045
C7	0,536±0.124	0.753±0.069	0.826±0.107
C8	1,142±0.211	0.861±0.162	1.040±0.299
C9	0,650±0.124	1.267±0.145	0.75±0.07
CM1	0,872±0.128	1.055±0.225	0.629±0.149
CM2	0,686±0.2	0.481±0.069	0.737±0.087
CM3	0,470±0.019	0.656±0.174	0.495±0.099