REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de **Master**

En Biologie

Spécialité : microbiologie appliquée

Par :

SEBBACHE Nesrine

BOUTRIG Karima

Thème :

L'évaluation de l'aptitude de formation de biofilm par des souches *Staphylococcus aureus* associées aux plaies

Soutenue publiquement le : 21/06 /2018. Devant le jury composé de :

Mr AINES Mahfoud	MCB	Université de Médéa	Président
Mr BOUBAKRI Kamel	MAA	Université de Médéa	Examinateur
Mme BOUMEDIENE Farida	MAA	Université de Médéa	Examinateur
Melle HOCEINI Amina	MAB	Université de Médéa	Encadreur

Année universitaire 2017/2018

REMERCIMENT

En tout premier lieu , nous remercions le bon dieu Allah, tout puissant, de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce travail et dépasser toutes les difficultés.

En second lieu, nous tenons à remercier notre chère promotrice : Melle **HOCEINI Amina**, pour ses précieux conseils sa confiance et son aide durant toute la période du travail.

Nous remercions profondément **Mr OUMOUNA M**, le doyen de notre faculté, un grand merci et on espère qu'il nous soit permis de vous exprimer vivement notre profonde gratitude, nos sentiments très respectueux.

Nous remercions **Mr AINAS M**, qui a accepter de présider ce jury dont je lui exprime notre haute considération.

Nous sincères remerciements vont à **Mme BOUMEDIENE F**, et **Mr BOUBAKRI**, d'avoir accepter d'examiner ce travail.

Nos profonds remercîments vont également à tous les enseignants qui nous ont donné les bases de la recherche pendant les cinq ans.

Un grand merci à **Mr KHAMOUCHE** laborantin dans l'hôpital de Beni-sliman et tous les personnes qui nous ont aidé et contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Nesrine et Karima

Dédicace

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu **Allah**, tout puissant, de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce trvail et dépasser toutes les difficultés.

Et le salut sur **Mohamed** le messager de dieu.

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

Toi ma mére **Zohra**, l'etre chère dans ma vie, toi qui est toujour là à me consoler, me soulager et m'encourager, toi qui donner le précieux .

De toi pour me voir réussir de jour en jour, mère tu es

<<la cause de ma réussite dans la vie>>

L'ètre que j'aime tant, toi mon père **Said** la source à lequelle j'ai toujours puissé patience et courage. Vos conciels, vos directives, << toi père la lueur de mon chemin>>.

A mes chères sœurs : **Akila, Samira, Saida, Nabila** et **Imane**

A mes frères : **Mohamed** et **Sofiane**.

A ma grande mère : **Massouda**

A mes tantes et à mon oncle

A chaque cousins et cousines

A tous qui prennent le Nom : **BOUTRIG**

A toutes mes copines et surtout : **Samia, Meriem, Nadia, Dalila, Fadila, Hassina**…..

A mon cher fiancé qu'est mon monde (**Omar**) et ses fréres (**Youcef** et **Ahmed**).

A tous mes professeurs.

A tout ma promotion Microbiologie Appliqué

Spécialement à mon binome : **Nesrine** et ma promotrice dans cette mémoire Melle **HOCEINI Amina** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail. A tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin.

Karima

Dédicace

Je m'incline devant Dieu le tout puissant qui m'a ouvert les portes du savoir et m'a aidé à la franchir .

Je dédie ce modeste travail :

A mes grands-parents : **Mahfoud** et **Lyakout.**

A mon père source de respect, en témoignage de ma grande reconnaissance pour tout l'effort et le soutien moral et matériel qu'il m'a toujours apport : **Saïd.**

A ma chère et tendre mère, source d'affection, d'amour, de courage et d'inspiration qui a tant sacrifié pour me voir atteindre ce jour : **Razika.**

A mes très chères sœurs et mes très chers frères : **Faiza** et son marie ***Hichem*** et le petit prince***Koki.*****Fatiha** et son fiancé **Malek, Bilal, Mohamed, Nadjet**et la joie de la maison, le merveilleux et le prince***Younes Amine.***

A ma très chère tante, ma source de courage : **Hakima.** et mon cher et seul oncle **Ahmed** et son épouse **: Saliha**

A toute la famille **SEBBACHE** et la famille **MENNANE.**

A tous mes cousins et cousines sans exception Surtout : **Khaoula**, **Hadjer**, **Sohaib**, et la petite princesse : **Mimi.**

A ma collègue et binôme, ma chère **Karima** et ma chère promotricce**, HOCEINI Amina.**

A mes intimes amies **: Nedjoud, Nadia, Bouchra, Karima, Fatiha, Yasmine, Habiba**

A mes proches amies : **Meriem**, **Soumia**, **Nossaïba**, **Samia**, **Amina** et **kheira**, **Fadila, Hassina, Wardia**, **Nawel**, **Rachda**, **Asma**….

A tous mes camarade de promotion de Microbiologie appliqué sans exception.

Je dédie et remercie spécialement à la personne qui est toujours à mes côtés et qui m'a donné toujours le courage : **Houssam.**

Et A tous ceux que je porté dans mon cœur et je n'ai pas pu citer le nom.

Nesrine

Résumé

Résumé

Les souches *Staphylococcus aureus* font partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses, elles sont les espèces les plus fréquemment isolées d'infections liées aux plaies. Leur principal facteur de virulence est leur capacité à adhérer à la surface des plaies et par la suite de former le slime.

Dix (10) souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolées à partir des prélèvements de plaies (plaies post-opératoire, plaies diabétique, abcès ombilical) effectués au niveau des salles de soin des polycliniques d'Ain el mordj et de pole-Médéa- et des services de chirurgie de l'hôpital de Médéa et de Beni-sliman.

L'étude de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques a montré une importante résistance aux B-lactamine.
L'évaluation de l'aptitude de formation de biofilm des dix isolats a révélé que la moitié (50%) des souches produisaient un slime bactérien par la technique du Rouge Congo (RCA), 80% des ces souches étaient modérément formatrice de biofilm par la technique TCP et 10% des souches ont formé un biofilm par la technique en tube (TM). L'étude de la corrélation des trois méthodes a montré que la technique en tube présentait une bonne corrélation avec la technique TCP pour les souches modérément productrices de biofilm.

Mots-clés : biofilm, *Staphylococcus aureus* , plaies, infection, antibiorésistance.

ملخص

سلالاتS.aureus هي جزء من الميكروبات المتعايشة في الجلد والأغشية المخاطية، فهي الأنواع الأكثر عزلة في كثير من الأحيان من الجروح المرتبطة بالالتهابات. عامل الضرر الرئيسي هو قدرتها على التمسك بسطح الجرح وتشكيل البيوفيلم لاحقا

تم عزل عشرة (10) سلالات من المكورات العنقودية الذهبية من عينات الجروح (الجروح بعد العمليات الجراحية، والجروح لمرضى السكري، خراجات السرية),من قاعات العلاج بعيادات كل من القطب الحضري و عين المرج بالمدية ومن مصلحة الجراحة بمستشفى المدية وبني سليمان.

وقد أظهرت دراسة قابلية السلالات المعزولة للمضادات الحيوية مقاومة كبيرة لـ Lactaminee-β

وكشف تقييم قدرة تشكيل البيوفيلم من طرف العشرة عزلات أن النصف (50٪) من السلالات ناتجة عن تقنية البيوفيلم البكتيرية (RCA) و 10 ٪ من السلالات ناتجة عن تقنية (TM) مشكلة للبيوفيلم, كما وجدنا ان 80٪ من هذه السلالات لها قدرة متوسطة في تشكيل البيوفيلم بتقنية (TCP).

كما أوضحت دراسة العلاقة بين الطرق الثلاثة أن تقنية الأنبوب لها ارتباط جيد مع تقنية (TCP) في السلالات التي لها قدرة متوسطة على تشكيل البيوفيلم.

كلمات مفتاحية:

بيوفيلم , الجرح, العدوى، المقاومة للمضادات الحيوية,s.aureus

Abstract

Staphylococcus aureus strains are part of the commensal flora of the skin and mucous membranes, and are the most commonly isolated species of wound-related infections. Their main virulence factor is their ability to adhere to the wound surface and subsequently form the slime.

Ten (10) strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from wound samples (postoperative wounds, diabetic wounds, umbilical abscess) performed at the polyclinic wards of Ain el mordj and pole-Medea and Surgery services of Medea Hospital and Beni Sliman.

The study of the susceptibility of isolated strains to antibiotics has shown significant resistance to β-lactam.

The evaluation of the biofilm formation ability of the ten isolates revealed that half (50%) of the strains produced a bacterial slime by the Red Congo (RCA) technique, 80% of these strains were moderately biofilm-forming by the TCP technique and 10% of the strains formed a biofilm by the tube technique (TM). The correlation study of the three methods showed that the tube technique showed a good correlation with the TCP technique for moderately biofilm producing strains.

Keywords: biofilm, Staphylococcus aureus, wounds, infection, antimicrobial resistance,

Table des matières

Table des matières

Résumer

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableau

Introduction…… 01

Partie I : Synthèse bibliographique

I-La peau …… ……. 03

I-1-La composition de la peau …… 03

I-1-1-L'épiderme…… 04

I-1-2-Le derme…… 04

I-1-3-L'hypoderme……..… 04

II-Les plaies

II-1-Classification des plaies ……. 04

II-1-1-Classification en fonction de l'origine……... 05

II-1-2-Classification selon les caractéristiques lésionnelles…… 05

II-1-3-Classification selon les propriétés bactériologiques…… 05

II-2-Les bactéries liées aux plaies…… 06

III- Les Staphylocoques

III-1- Description et identification…… 06

III-1-2- Staphylococcus aureus…… 07

III-1-2-1-Facteurs de virulence…… 08

III-1-2-1-1-Proteines de surfaces…… 08

III-1-2-1-2-Les protéines secrétées…… 09

III-1-2-1-3-Les cytotoxines…… 09

III-1-2-1-4-Les toxines pyrogéniques…… 09

III-1-2-1-5-Les enzymes…….. 10

III-1-3-Pouvoir pathogène……. 10

IV : Biofilm

IV-1-Historique…… 11

IV-2-Définition……... 11

IV-3-Etapes de formation des biofilms…….. 12

IV-3-1-L'adhérence réversible…… 13

IV-3-2-L'adhérence irréversible…… 13

IV-3-3-La formation de micro-colonies…… 13

IV-3-4-Maturation du biofilm…… 13

IV-3-5. Dispersion du biofilm…… 14

IV-4-Composition et organisation du Biofilm…… 14

IV-4-1-Composition d'un biofilm…… 14

IV-4-1-1-Les microorganismes…… 14

IV-4-1-2-La matrice……. 15

IV-4-2-Organisation d'un biofilm…… 15

IV-5-Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm……...…… 15

IV-5-1-Les caractéristiques de la surface…… 16

IV-5-2-Les caractéristiques du milieu…… 16

IV-5-3-Les caractéristiques des microorganismes…….…… 16

IV-6-Les biofilms et la peau…… 17

IV-7-Les biofilms de *S. aureus*.……...…… 17

IV-7-1-Organisation du biofilm chez *S. aureus*.……...…… 18

IV-7-2-Les composants du biofilm de *S. aureus*.……...…… 18

IV-7-2-1-Microorganisme……...…… 18

IV-7-2-2-Matrice…… 19

IV-7-3-Résistance de *S. aureus* et de biofilm aux antibiotiques……………… 19

V: Les méthodes de détection de biofilm

V-1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)………………..………… 22

V-2. La méthode en tube (TM)……………………………………..……… 22

V-3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA)……………………………… 23

V-4.Le Biofilm Ring Test (BFRT)………………………………………….. 24

Partie II :Matériel et méthodes

I-Matériel

I-2- Matériels d'identification biochimique……………………………….. 25

I-3- Disques d'antibiotiques………………………………………………… 25

I-4- Matériel d'étude du biofilm……………………………………………. 25

I-5-Autre Matériel……………………………………………………….... 26

I-6- Autre produits………………………………………………………… 26

II. Méthodes

II-1-Période et lieu d'étude………………………………………………… 27

II-2- Objectif d'étude ……………………………………………………. 27

II-3- Prélèvement………………………………………………………… 27

II-4- Analyse des prélèvements……………………………………………. 28

II-5- Identification phénotypique des isolats……………………………… 28

II-5-1- Examen macroscopique…………………………………………… 28

II-5-2- Examen microscopique……………………………………………….. 29

II-6- Identification biochimique …………………………………………….. 29

II-6-1- Tests d'orientations ………………………………………………… 29

II-6-2- Identification par la galerie (API®*Staph)*………………………….. 30

II-7- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques ……………………… 31

II-8-Étude de la formation de biofilms de *S. aureus*

II-8-1-La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)…….. 33

II-8-2- La méthode de microplaques de titration…….. 34

II-8-3- La méthode en tube TM (Christensen, 1982)…… 36

III-Résultats et discussion

III-1-Prélèvement…….. 38

III-2-Analyse des prélèvements…… 38

III-2-1-Identification des souches isolées……. 38

III-2-1-1-Aspect des colonies…….. 38

III-2-1-2-Aspect microscopique……. 40

III-2-3-Résultats de l'identification biochimique des isolats……. 40

III-2-3-1-Résultats des tests d'orientation…… 40

III-2-4-Tableau récapitulatif des résultats de l'identification des *Staphylococcus aureus*……..... 41

III-2-5- Résultats de l'identification biochimique par API® StaphBioMérieux®…… 41

III-2-6- La fréquence des *Staphylococcus aureus*……..... 42

III-3-Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques……. 43

III-4- Résultats de l'étude de la formation de biofilms chez *S. aureus*……... 47

III-4-1- Technique Rouge Congo…… 48

III-4-2- Formation de biofilms en microplaques……. 50

III-4-2-1-Résultats de Formation de biofilm par TCP sans supplément (2% saccharose)…… ……. 50

III-4-2-2-Résultats de Formation de biofilm par TCP avec supplément (2% saccharose)…….. ……. 52

III-4-3- Production de biofilm par la méthode de culture en tube TM…… 55

III-4-4- Résultats de la formation de biofilm de *S.aureus* par les deux techniques TCP et TM…….. 57

III-4-5-Comparaison des trois techniques TM, TCP et RCA…….. 58

III-5-Fréquence de formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* chez les différent types des plaies……..... 60

Conclusion…… 61

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Différents caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus*.…… 07

Tableau 02 : Les importants variables intervenant dans la fixation des cellules microbiennes et la formation de biofilm…… .21

Tableau 03 : Liste des antibiotiques testés…… 32

Tableau 04: Répartition des prélèvements selon les types des plaies…… 38

Tableau 05: Résultats de pré-identification par les techniques microbiologiques standards …… 41

Tableau 06 : Tests biochimiques du *S.aureus*.…… 42

Tableau 07: résultats d'antibiogramme pour les 10 souches de Staphylococcus aureus isolées à partir des différents types des plaies…… 43

Tableau 08: Fréquence de slime parmi les différents types des plaies par la méthode Rouge congo agar…… 48

Tableau09 :Résultats total de la production de slime par la méthode RCA…… 49

Tableau 10. Fréquence de slime parmi les différents types des plaies par la méthode TM…… 51

Tableau11 : Fréquence total de slime par la méthode de culture en tube TM…… 52

Tableau12 : Résultat d'absorbance des souche par TCP…….. 53

Tableau13 : Résultats de TCP avec 2% de saccharose……. 54

Tableau 14. Fréquence des souches formatrices de slime isolées à partie de différents types des plaies par la méthode TM …… 56

Tableau15 : Fréquence de souches productrices de slime par la méthode de culture en tube TM……. 56

Tableau16 : Classification du biofilm formé par *Staphylococcus aureus* isolées des plaies par TCP et TM…… 57

Tableau 17. Dépistage des 31 souches de staphylocoques isolées pour la détection de la formation de biofilm par les trois méthodes TCP, TM et RCA…… 58

Tableau 18 : le nombre des souches de *S.aureus* formatrices de biofilm par les trois méthodes dans les différents types des plaies…… 60

Liste des photos personnelle :

Photo personnelle 01 : prélèvement du pus par ecovillnnage…… 27

Photo personnelle 01: microplaque de titration…… 34

Photo personnelle 03: Détection et lecture de biofilm par méthode TCP…… 35

Photo personnelle 04: Colonie de *S. aureus* sur milieu chapman……. 39

Photo personnelle 05 : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* isolées sur milieu gélose au sang…… 39

Photo perssonnel 06 : coloration de gram (objectif x 100)…….. 40

Photo Personnelle 07 : production de catalase par les cocci à gram positif isolés.. 40

Photo personnelle 08: Résultat du test de coagulase libre…… 41

Photo personnelle 09 : résultat d'une galerie de *S. aureus* API® Staph…… 42

Photo personnelle 10 : Effect des disques d'antibiotique sur quelques souche de *Staphylococcus aureus* (original) (y)…… 46

Photo pesonnelle 11 : Dépistage de la production de biofilm par la méthode en Rouge Congo Agar (RCA)…… 49

Photo personnelle 12 : Formation de biofilm par *S.aureus*par la technique TCP… 50

Photo personnelle 13 : Dépistage de la production de biofilm par la méthode en tube (TM) …….. 55

Liste des figures :

Figure01 : Coupe histologique de la peau…… 03

Figure02 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique……. 08

Figure03 : Observation d'un biofilm bactérien par microscope électronique à balayage (MEB)…… 12

Figure04 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilmet visualisation par microscopie…… 13

Figure05 : représentent des biofilms de *Staphylococcus aureus* présents à la Surface de la peau obtenues par microscope électronique à balayage (MEB)…… 18

Figure06 : Formation de biofilm en microplaque…… 22

Figure07 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM…… 23

Figure08 : Culture sur la gélose Rouge Congo…… 23

Figure09 : Le principe de Biofilm Ring Test…… 24

Figure 10 : Principe de la mesure de la biomasse par la méthode de TCP…… 35

Figure11 : Fréquence de prélèvement positif à *S.aureus*…… 42

Figure12 :fréquence de *S.aureus*dans les différentes types des plaies…… 43

Figure13 : les taux de résistance et de sensibilités de *s.aureus* isolés à partir des plaies…… 45

Figure14 : Fréquence de résultat de la production deslime par la méthode RCA……. 49

Figure15 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm par les isolats de *S.aureus* (sans saccharose)…… 51

Figure16 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm *in vitro* par les souches isolées à partir des plaies (avec 2% saccharose)…… 53

Figure17 : Formation de biofilm par S*taphylococcus aureus*par la technique TCP dans les différents milieux…… 54

Figure18 : Fréquence de la méthode de culture en tube TM…… 57

Liste des abréviation :

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATB : antibiotique

BFRT :Biofilm Ring Test

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

CMI : concentration minimal inhibitrice

CMH II : protéines du complexe majeurd'histocompatibilité de classe II

CV : Cristal Violet

DO : densités optiques

EDS : l'eau distillé stérile

EPS : exopolysaccharides

H2O2 : l'eau oxygéné

MH :milieu Mueller-Hinto

MSCRAMM : microbial-surface components reconizingadhesive matrix

Molecules

MEB : microscope électronique à balayage

MLS : Macrolides, Lincomycines, Streptogramines

PBS : tampon phosphate salin

PIA :Polysaccharide IntercellularAdhesion

PO : plaies opératoires

PD : plaies diabétiques

PLP : Protéine Lien Pénicilline

PM : plaies ombilical

RCA :la culture sur milieu rouge Congo

SCP :sous-espèces à coagulase positive dont *S. aureus.*

SCN : sous-espèces à coagulase négative dont *S. aureus*

SFM :Société Française de Microbiologie

TSST-1 : toxine du syndrome du choc toxique 1.

TCP :méthode de Plaque de culture de tissus

TM :méthode en Tube

Introduction

Introduction

Introduction :

La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vi ou la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental (état planctonique) **(Filloux et vallet, 2003).** Ce système, appelé <<biofilm>> est une communauté microbienne fixé à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice **(Ouchar mahamati et *al*., 2013).**

Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets négatifs sur la santé. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, l'émergence des infections nosocomiales. En effet, les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme **(Hall-Stoodley *et al*., 2004 ; Chalvet de Rochemonte, 2009 ; Ouchar mahamati *et al*., 2013)**, ils constituent alors des réservoirs de pathogènes **(Lebeaux, 2012).**

La présence supposée de biofilm est de plus en plus évoquée ces dernières années. Elle concernerait plus de 60% des plaies chroniques et serait plus occasionnelle sur les plaies aigües **(Fromantin, 2012).**

Les staphylocoques représentent une proportion importante parmi les bactéries responsables d'infections graves. Ils sont observés dans de multiples situations cliniques, aussi bien en pathologie communautaire qu'en pathologie nosocomiale **(Zahlane, Haouach, et Zouhdi, 2007)**.

Le principale espèce responsable des infections dues à la présence d'un matériel étranger est: *Staphylococcus aureus*. Leur principal facteur de virulence est leur capacité d'adhérer aux surfaces et de favoriser la formation de biofilm. Le problème majeur avec cette forme de vie est qu'elle confère une résistance aux antibiotiques, et aux attaques du système immunitaire, ce qui place les cliniciens face à une difficulté d'éradiquer ces microorganismes.

L'étude de ces bactéries productrices de biofilms suscite donc un grand intérêt, car elles pourraient servir de source de contamination microbienne ou de transmission de maladies **(Ouchar mahamati*et al*., 2013)**.

Introduction

L'objectif de ce travail est d'étudier le pouvoir de formation de biofilm des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir des plaies .

Ce travail est constitué de quatre parties :

La première est une synthèse bibliographique qui rassemble des informations sur les plaies, la bactérie *S.aureus*, et les propriétés du biofilm.

La deuxième partie détaille les matériels et méthodes ; dont on a adopté la démarche expérimentale suivantes :

- Prélèvements.
- Isolement et identification des souches cliniques.
- Evaluation de la formation de biofilm par trois méthodes : (RCA, TCP, TM).

La troisième partie consacre aux résultats et la discussion donne des résultats pertinents et clairement argumenté.

Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettre de tirer quelque perspectives des prolongement à ce travail.

Synthèse Bibliographique

I-Généralité

I-1-La peau :

La peau constitue le plus grand organe du corps humain avec une surface d'1,8 m^2 représentant approximativement 7 kg pour une personne de 65kg, soit plus de 10% de la masse corporelle **(Schaefer et *al*., 1996).** Grace à ses propriétés de barrière entre l'organisme et l'environnement, les fonctions de la peau sont d'une part, une protection contre les agressions de l'extérieur et d'autre part, un maintien de l'homéostasie. Les agressions extérieures comprennent par exemple les produits chimiques, les bactéries, les allergènes, les champignons, les radiations mais également les changements de températures et d'humidité. La peau contribue à l'homéostasie du corps grâce notamment à la thermorégulation et à la sécrétion de sébum et de sueur. La peau est également le siège du sens du toucher **(Tran et *al*., 2009 ; Kenneth et *al*., 2002).**

I-1-1-La composition de la peau.

Les principales couches cutanées comprennent de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme constitué du *stratum corneum*et de l'épiderme vivant, le derme et l'hypoderme, auxquelles s'ajoutent les annexes cutanées dont les follicules pileux, les glandes sudoripares, les glandes sébacées et les ongles **(Tran et *al*., 2009 ; Kenneth et *al*., 2002). (Figure 1).**

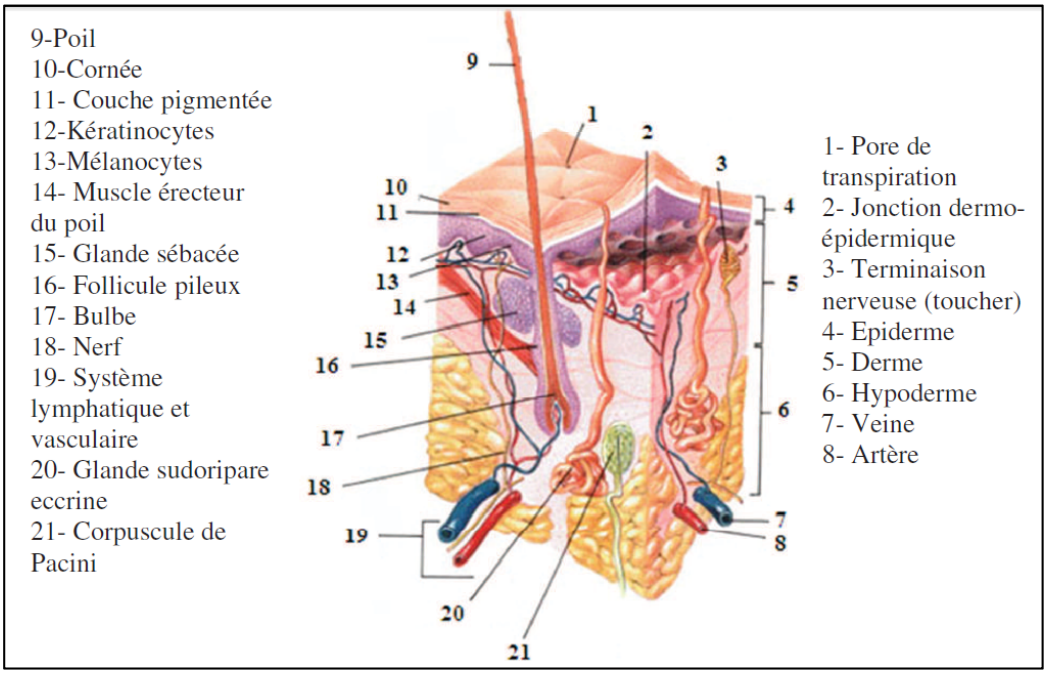


Figure 01 : Coupe histologique de la peau **(OLBRDAD, 2014).**

I-1-1-1-L'épiderme

L'épiderme comprend l'épiderme vivant constitué de plusieurs couches de cellules (les kératinocytes) et la couche cornée ou *stratum corneum* constituée de cellules mortes (les corneocytes) **(Pouillot *et al*., 2008).**

I-1-1-2-Le derme.

Le derme permet non seulement d'apporter les nutriments, l'immunité et d'autres supports à l'épiderme mais aussi d'avoir un rôle dans la régulation de la température, de la pression et de la douleur. Le derme a une épaisseur de 0,1 à 0,5 cm. C'est un tissu conjonctif composé de fibres de collagène (70%) et de fibres élastiques dans une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et glycoprotéines. Il est le siège d'un important réseau vasculaire et nerveux.

Les principales cellules présentes sont les fibroblastes qui produisent le tissu conjonctif, et les mastocytes qui sont impliqués dans l'immunité et les réponses inflammatoires. Des cellules dendritiques et des globules blancs sont également présentes **(Kenneth et *al*., 2002) .**

I-1-1-3-L'hypoderme.

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué d'adipocytes arrangés en lobules et il est relié au derme par des fibres de collagène et d'élastine, formant un tissu conjonctif lâche. L'hypoderme a un rôle d'isolant thermique, de protection contre les chocs et de réservoir énergétique **(Kenneth et *al*., 2002).**

II-Les plaies :

La plaie est une effraction cutanée qui présente des risques de contaminations d'origine endogène (propre flore du patient dite "commensale") et d'origine exogène (flore dite "transitoire") venue de l'extérieur. **(BRANGER, 2004).**

II-1-Classification des plaies :

Il n'existe pas de classification reconnue. Néanmoins, les plaies peuvent être classées selon :

- leur origine ;
- leur nature lésionnelle ;
- leurs propriétés bactériologiques ;
-leur stade clinique **(Remy, 1994 ; White, 1999).**

II-1-1-Classification en fonction de l'origine

Les plaies peuvent être chirurgicales ou accidentelles. Les plaies chirurgicales sont franches et aseptiques. A l'inverse, les plaies accidentelles, simples ou contuses, sont le plus souvent septiques.

Les plus fréquentes causes des plaies cutanées sont les traumatismes, comme ceux causés lors d'accident de la voie publique, et les morsures

Parmi les autres origines, peuvent être citées :

- les brûlures (chimiques ou thermiques) ;
- les blessures par arme à feu ;
- les piqûres ;
- les lacérations par piège **(Gregory, 1999).**

II-1-2-Classification selon les caractéristiques lésionnelles

Ces plaies sont associées à des destructions cellulaires. Elles sont nommées :

- superficielles ou abrasions : elles résultent de frottements répétés et cicatrisent sous une croûte formée de sang et d'exsudat séreux desséchés ;
- composées : plus profondes, elles intéressent différents types de tissus ;
- pénétrantes : elles atteignent les cavités naturelles et nécessitent des soins particuliers ;
- perforantes, lorsque l'objet responsable traverse complètement les tissus et ressort dans une localisation anatomique différente ;
- les déchirures, souvent très profondes et aux marges irrégulières ;
- les avulsions, caractérisées par la séparation de la peau et du tissu conjonctif sous-cutané des tissus sous-jacents **(White, 1999 ; Johnston, 1992).**

II-1-3-Classification selon les propriétés bactériologiques

Elles dépendent à la fois de l'origine de la plaie et de son stade d'évolution. En effet, une plaie chirurgicale sera en général aseptique contrairement à une plaie accidentelle.

Les plaies suivent une évolution au niveau bactériologique, qui peut être divisée en 3 phases **(Asimus, 2001 ; Remy, 1994)**:

- la phase de latence : recouvre les six premières heures après la survenue de la plaie. Les modifications tissulaires fournissent un substrat favorable au développement des bactéries. Pendant cette phase, la plaie est dite« contaminée » ;
- la phase de multiplication : pendant les six heures suivantes, les germes se multiplient. La plaie est dite « infectée »
- la phase de dissémination : au-delà de 12 heures, les germes gagnent les tissus avoisinants. La plaie est dite « largement infectée » **(Remy, 1994).**

II-2-Les bactéries liées aux plaies :

De façon normale, l'ensemble de la peau est colonisée par des microorganismes tels que les bactéries appelées flore cutanée commensale **(Noble et Willie, 1980).**

Le pouvoir pathogène de ces microorganismes est très faible. La densité et la nature des bactéries présentes à la surface de la peau varient en fonction de la localisation anatomique. En effet selon le pH et le taux d'humidité, la densité est plus importante avec des taux d'humidité élevés et l'adhésion plus forte au niveau des sites anatomiques faiblement humides et légèrement acides**.** Cette flore commensale contribue à l'équilibre et l'intégrité de la peau dans la mesure où elle protège l'organisme contre les bactéries pathogènes en empêchant leur prolifération. Cet équilibre dépend également de la production de protéines antibactériennes telles que la lactoferrine, les cathélicidines de type β-défensines ou les lysozymes**.** Dans le cas d'une plaie, cet équilibre est altéré par une modification du pH, des substrats disponibles et des taux d'humidité par exemple permettant la colonisation par les bactéries pathogènes aboutissant à l'infection de la plaie. Les principales espèces bactériennes rencontrées dans l'infection des plaies sont le *Staphylococcus aureus* (34%) et *Pseudomonas aeruginosa* (9,4%) **(Percival et *al*., 2012).**

III- Les Staphylocoques :

III-1- Description et identification

Les staphylocoques sont des germes ubiquitaires et commensaux, ils représentent près de 50% des bactéries aérobies isolées sur la tête, les aisselles, les bras, les jambes et dans les narines. Ils jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière contre les bactéries de la flore transitaire **(Davido, 2010).**

Leurs distributions sur la peau n'est pas uniforme. Il existe des niches préférentielles qui témoignent d'une adaptation de certaines espèces aux différentes régions de la peau **(Corbière Morot-Bizot, 2006**)**.**

Le critère de base de la classification des espèces de staphylocoques reste la production de coagulase libre, enzyme responsable de la coagulation des sérums humain et cunicole. On distingue ainsi sept espèces et sous-espèces à coagulase positive dont *S. aureus* (SCP) et quarante à coagulase négative (SCN) **(Bascomb et Manafi, 1998)**. A la différence de *Staphylococcus aureus*, les staphylocoques « blancs » principalement *Staphylococcus epidermidis*(70%), font naturellement partie des flores cutanéomuqueuses de l'homme. Ces staphylocoques sont potentiellement pathogènes essentiellement dans certaines circonstances : implantation de corps étrangers et/ou déficit immunitaire **(Anonyme, 2006-2007).**

III-1-2- Staphylococcus aureus :

Staphylococcus aureus est un germe appartenant au groupe des cocci à Gram positif qui pousse en amas **(Figure 2)**. Cette bactéries non productrice de spores mais résistante, peut survivre longtemps sur des objets inanimés et secs, elle résiste aussi relativement bien à la chaleur. **(Tableau1) (Schaechter et *al*., 1999).**

S.aureus est communément appelé staphylocoque doré, est un staphylocoque à coagulase positif **(Couderc et *al*., 2014).**

Tableau 1. Différents caractères bactériologiques de *Staphylococcus aureus*

(Prescott L., et *al* 2010).

Morphologie	Regroupé en paire, tétrade ou amas réguliers Immobile ; non sporulé
Dimension (mm)	0.5-1
Teneur en GC (mol%)	33%
Taille du génome (Mb)	2.8-2.9
Type respiratoire	Aéro anaérobie facultatif
Type trophique	Chimioorganotrophe
Métabolisme	Fermentaire et /ou respiratoire
Autre caractères	Catalase positive – oxydase négative Halophile – mésophile (37°C) et psychrophile (6-12°C) Neutrophile pH opt=7 ; pHm ; Aw : basse, jusqu'à 0,83

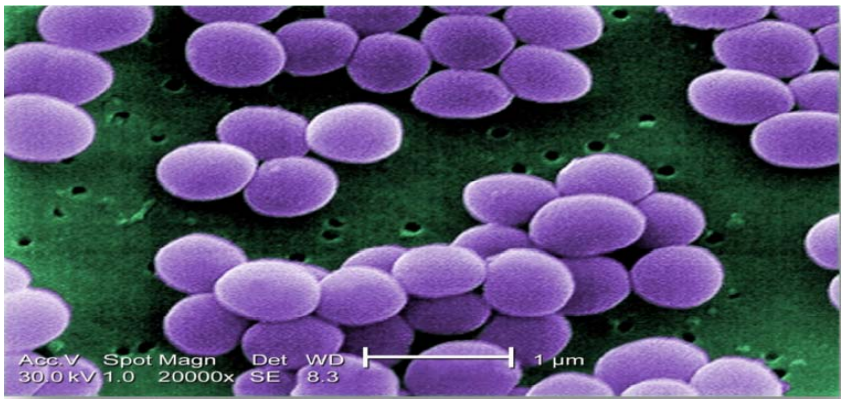


Figure2 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)

(http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine)

III-1-2-1-Facteurs de virulence :

Staphylococcus aureus est l'une des bactéries les plus fréquemment retrouvées en pathologie humaine. C'est un germe commensal des flores cutanées et digestives, il est retrouvé au niveau des fosses nasales de manière persistante chez environ 20% des individus et de manière transitoire chez 30% de la population générale.

Il est impliqué dans une très grande variété d'infections communautaires ou nosocomiales : furoncles, abcès, arthrites septiques, ostéomyélites, septicémies, pneumopathies, diarrhées infectieuses, endocardites, méningite etc.

Ce pouvoir pathogène s'explique par la présence d'un très grand nombre de facteurs de virulence qui permettent à *S. aureus* de coloniser, de persister au sein des flores et d'échapper au système immunitaire de ses hôtes. Il est de plus capable de résister à l'action d'un très grand nombre d'antibiotiques et d'antiseptiques **(Prescott et *al*., 2010).**

III-1-2-1-1-Proteines de surfaces :

Les protéines présentes à la surface de *S. aureus* ont de nombreux points communsentre-elles. Elles se composent en général d'une séquence signal sécrétrice, d'une partie composée d'acides aminés chargés positivement dans le cytoplasme, d'un domaine membranaire hydrophobe et d'une zone d'ancrage dans la paroi cellulaire.

Certaines d'entre elles possèdent un domaine de liaison exposé à la surface de labactérie qui leur confère les propriétés d'adhésine. La protéine A, qui est le prototype de ces protéines, a des propriétés anti phagocytaires par sa capacité à se lier à la partie Fc des immunoglobulines.

Les MSCRAMM <<microbial-surface components reconizing adhesive matrixmolecules≫, forment un ensemble de protéines qui, comme son nom l'indique, sont caractérisées par leur capacité à se lier à des éléments de la matrice extracellulaire. Il semblerait qu'elles jouent un rôle majeur dans la capacité des staphylocoques à envahir les tissus de l'hôte **(Lowy, 1998).**

III-1-2-1-2-Les protéines secrétées

Les staphylocoques produisent un grand nombre de molécules qui sont regroupées surla base de leur mécanisme d'action **(Lowy, 1998).**

III-1-2-1-3-Les cytotoxines

Les cytotoxines (alpha-toxine par exemple) provoquent la formation de pores et des modifications pro-inflammatoires dans la cellule. Ces modifications sont à l'origine de dommages cellulaires et participent à l'expression du syndrome septique **(Lowy, 1998).**

III-1-2-1-4-Les toxines pyrogéniques

Ce sont des superantigènes capables de se lier aux protéines du complexe majeurd'histocompatibilité de classe II (CMH II). Cette liaison induit la prolifération des cellules T et la production de cytokines. Les toxines pyrogéniques les plus connues sont :

− Les entérotoxines responsables de l'intoxication alimentaire et du syndrome du choc toxique.

− La toxine du syndrome du choc toxique 1 (TSST-1) est structurellement très proche des entérotoxines. Le gène codant pour cette toxine est retrouvé chez 20% des

S. aureus isolés.

− Les toxines exfoliatives (ex : toxines épidermolytiques A et B) causent un érythème et un décollement de la peau. Leur mécanisme d'action est controverse **(Lowy, 1998).**

III-1-2-1-5-Les enzymes

Les staphylocoques produisent un grand nombre d'enzymes responsables de la destruction des tissus. Ces enzymes facilitent la dissémination des bactéries au sein des tissus, mais leur implication dans la pathogenèse de l'infection n'est pas encore bien définie. Citons par exemple :

− La Bêta-lactamase qui est une enzyme située dans la membrane cytoplasmique responsable de l'inactivation de la pénicilline. L'apparition d'une nouvelle bêta lactamase est actuellement responsable de la résistance des staphylocoques aux pénicillines et aux céphalosporines.

− La coagulase qui est un activateur de la prothrombine, permet la conversion du fibrinogène en fibrine. Cependant son implication dans la virulence de la bactérie est

incertaine **(Lowy, 1998).**

III-1-3-Pouvoir pathogène :

S. aureus est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compteparmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et communautaires (**Vincenot *et al*., 2008; Kurlenda et Grinholc, 2012; Otto, 2012**). Les infections suppuratives superficielles cutanéo-muqueuses tels les furoncles, les folliculites, les impétigos, les sinusites et les otites sont les plus couramment rencontrées. Ces infections peuvent se compliquer par une diffusion hématogène de la bactérie ou par une extension locorégionale de l'infection. *S. aureus* est aussi responsable de méningites, des infections respiratoires et urinaires.

Des infections non suppuratives d'origine toxique appelées toxémies staphylococciques sont, elles, dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes cutanés staphylococciques par les exfoliatines, le choc toxique staphylococcique et les intoxications alimentaires par les entérotoxines (**Foster, 1996 ; Harris *et al*., 2002**). En plus des infections aiguës, *S. aureus* peut provoquer des infections chroniques. La plupart d'entre elles sont dues à la capacité de ce pathogène à adhérer sur les implants médicaux temporaires (ex: cathéters) ou permanents (ex: prothèses orthopédiques, valves cardiaques) et à former un biofilm **(von Eiff *et al*., 2005 ; Harris et Richards, 2006 ; Bernard, 2006).**

IV : Biofilm

IV-1-Historique

La découverte des biofilms est attribuée à Leeuwenhoek **(1683)** qui observa la présence des communautés de microorganismes à la surface de ses propres dents.

Zobell **(1943)** montra que, dans le milieu marin, la quantité de bactéries fixées sur un substrat est largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide.

Jones **(1969)**, travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux, confirma nonseulement les agrégats mono ou poly-microbiens, mais aussi l'existence d'une matrice polyosidique.
Characklis **(1973)** démontre que des dépôts microbiens installés dans des conduites d'eau de systèmes industriels apparaissent résistants aux désinfectants.
Costerton**(1978)** et son équipe proposaient la théorie des biofilms en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté pour la plupart des microorganismes **(Harold *et al.*, 1997 ; Branger, 2007 ; Givskov *et al.*, 2007)**.

IV-2-Définition

Le biofilm est un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes, 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.

Ces surfaces peuvent prendre plusieurs formes ; minérales (roche, interface air-liquide…..) ou organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surfaces alimentaires ou coques des navires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) **(Branger *et al.*, 2007 ; Bellifa, 2014).**

Les biofilms sont très hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Ils sont constamment remodelés, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes. Ils présentent une grande diversité aussi bien au niveau structural. Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes **(Tolker-Nielson *et al.*, 2000) (figure 03).**

La diversité des biofilms constituerait l'un des éléments clés dans leur robustesse face aux agents antimicrobiens et autres agressions **(Singh *et al.*,2002).**

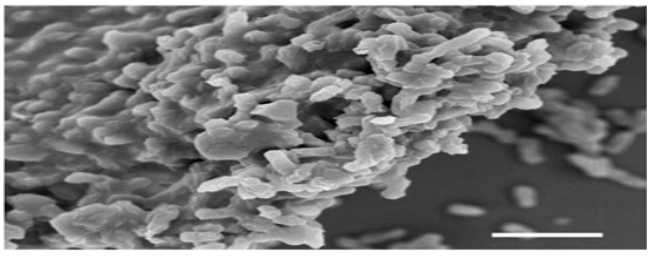


Figure03 : Observation d'un biofilm bactérien par microscope électronique à balayage (MEB) **(Hawari, 2009).**

IV-3-Etapes de formation des biofilms :

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

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm **(figure 04) (Talaro, 2008).**

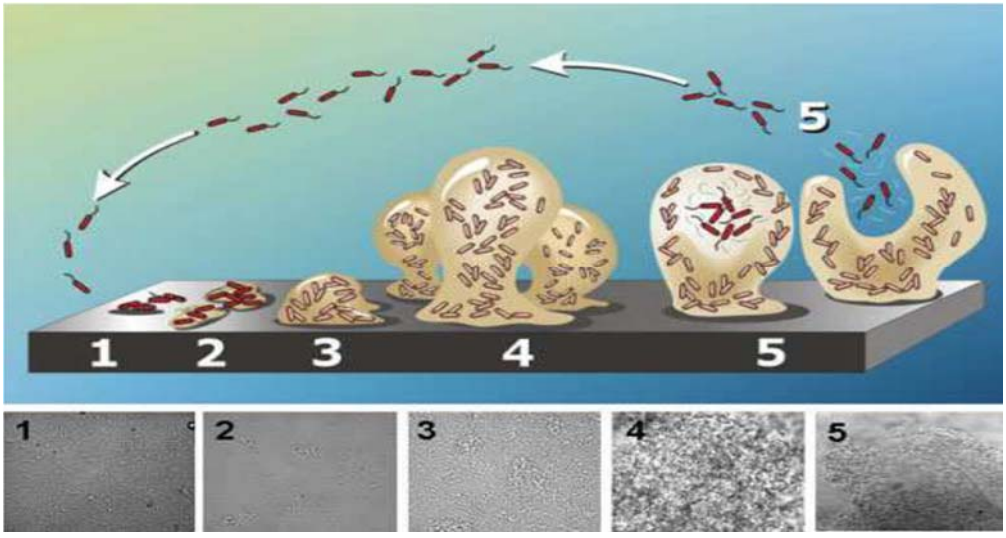


Figure04 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm et visualisation par microscopie à transmission : 1 adhésion réversible, 2 adhésion irréversible, 3 formation de micro-colonies, 4 maturation, 5 détachement **(Stoodley*et al*., 2002).**

IV-3-1-L'adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité et en présence d'un film conditionnant, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles) **(Hoiby *et al*., 2011).** Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher. Cette étape est influencée par des conditions environnementales **(Branger *et al*., 2007 ; Pecastaings, 2010; Muller et Guaguere, 2014)**.

IV-3-2-L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible et forte en raison de la production d'exopolysaccharides (EPS) par les bactéries et surtout grâce à les liaisons de type hydrophobe qui s'établie entre ces deux **(Branger *et al*., 2007 ; Hoiby *et al*., 2011 ; Bellifa, 2014)**. Dans un second temps les structures d'adhérence bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E. coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface, jouent un rôle important dans cette étape. **(Beloin *et al*., 2008)**.

IV-3-3-La formation de micro-colonies:

Une fois l'attachement des bactéries irréversibles, les bactéries commencent à se diviser et à former des micro-colonies (**Chmielewski et Frank, 2003).** qui vont recouvrir toute une partie de la surface (**Stanley et *al*., 2003).**

IV-3-4-Maturation du biofilm

Au sein d'un biofilm mature, les microorganismes sont séparés par des aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfuies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets **(Filloux et Vallet, 2003).**

Le développement des micros colonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelle surface. **(Roux *et al*., 2006).**

Les colonies se trouvent normalement séparées les unes des autres par des canaux où circule le flux du milieu qui permet la diffusion des nutriments, d'oxygène et parfois d'agents antimicrobiens **(Donlan, 2002)**, et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien **(Costerton, 1999).** Finalement l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation **(Clutterbuck et Woods, 2007).**

IV-3-5. Dispersion du biofilm

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables: limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles **(Sauer*et al*., 2002).**

Le détachement des bactéries se fait selon trois étapes **(Kaplan, 2010)** :

1. Détachement des cellules de la colonie du biofilm.

2. Translocation des cellules vers un nouvel emplacement.

3. Fixation des cellules à un substrat dans le nouvel emplacement.

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance **(Chalvet et Rochemonteix, 2009).**

IV-4-Composition et organisation du Biofilm

IV-4-1-Composition d'un biofilm

Le biofilm est constitué essentiellement de microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce impliquée alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm. (**Costerton, 1999; Sutherland, 2001; Donlan, 2002).**

IV-4-1-1-Les microorganismes

Seuls quelques biofilms sont composés d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des microorganismes. Alors que les biofilms naturels sont souvent composés de nombreux types de microorganismes: bactéries, protozoaires, algues, mycètes, chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées **(Branger *et al*., 2007 ; Alnnasouri, 2010).**

IV-4-1-2-La matrice

Elle est composée principalement de :

- L'eau : demeure le principal composant du biofilm.

- Des EPS : éléments structuraux majeurs de biofilm, représente jusqu'à 85% de la masse totale.

- Débris cellulaires (protéines, acides nucléiques).

- Déchets du métabolisme cellulaire.

- Débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaires).

(Branger *et al*., 2007 ; Bellifa, 2014).

IV-4-2-Organisation d'un biofilm

Le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes séparés par des « canaux aqueux » assurant la circulation de fluides et permettant à la fois l'apport de nutriments à la bactérie et l'élimination de leurs produits de dégradation. Le biofilm n'est pas un environnement homogène, car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, (qui présentent des valeurs de pH différents), les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments **(Roux et Ghigo., 2006).**

IV-5-Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm

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

IV-5-1-Les caractéristiques de la surface

Le contacte d'un matériau avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm :

-La rugosité: plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante.

-Les propriétés chimiques d'une surface : peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon et le plastique.

-La présence préalable de films protéiques: comme le sang, les larmes, l'urine…..etc influencent l'attachement de bactéries à cette surface, et favorise laformation de biofilm **(Bellifa, 2014).**

IV-5-2-Les caractéristiques du milieu

Le mode de culture est une caractéristique importante qui peut modifier fortement l'adhésion des organismes ainsi que les conditions environnementales telle que :

-La disponibilité de nutriments : excès ou carence.

-Les différents stress physicochimiques : pH, température présence de composés bactéricides ….etc.

-Composition de milieu : présence de calcium, magnésium, phosphate, glucose …etc. semble faciliter l'adhésion à un support **(Marchal, 2010)**.

IV-5-3-Les caractéristiques des microorganismes

Les pili, exprimés par les bactéries, sont impliqués dans l'adhésion bactéries- cellules et les EPS, synthétisés par les bactéries, facilitent aussi la fixation aux surfaces. L'adhésion est également sous la dépendance de l'état physiologique de la bactérie, le caractère hydrophobe, de sa charge électrique globale et de l'énergie libre de la surface **(Hygis, 2010).**

IV-6-Les biofilms et la peau

La peau est importante dans le maintien de la santé humaine et aussi pour l'invasion des agents microbiens qui peuvent être pathogènes. La peau est considérée comme une source d'infection causée par des microorganismes présents dans la peau qui sont aptes à former un biofilm. **(Percival *et al*., 2012 (Figure 05)**

Lors de l'infection d'un organisme par des biofilms les bactéries pénètrent dans l'organisme sous forme planctonique cette dernière stimule une réponse immune de l'hôte, elle adhère à une surface au sein de l'organisme et forme un biofilm (bactéries sessiles) qui sont protégées par la structure de biofilm lui-même (la matrice), donc les anticorps ne peuvent pas détruire les bactéries du biofilm attaché et endommagent les tissus **(Chalvet de Rochemonteix, 2009).**

Les biofilms sont retrouvés dans les plaies et sont suspectés de retarder la cicatrisation de certaines plaies. L'analyse par microscopie électronique de biopsies provenant de plaies chroniques a révélé que 60 % des échantillons contenaient des structures de biofilms, ils

constituaient un facteur majeur contribuant à de multiples maladies inflammatoires chroniques **(Phillips *et al*., 2010).**

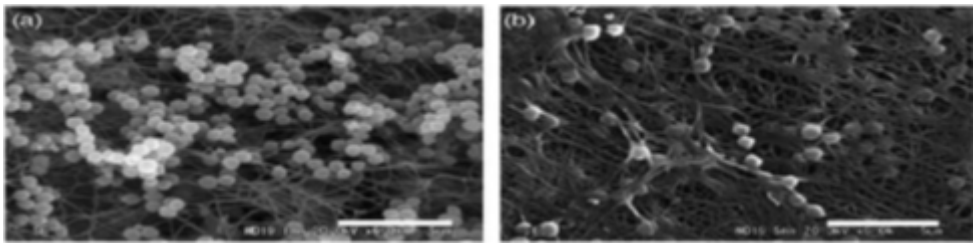


Figure05 :(a) et (b) représentent des biofilms de *Staphylococcus aureus* présents à la surface de la peau obtenues par microscope électronique à balayage (MEB) **(Chalvetde Rochementeix, 2009).**

IV-7-Les biofilms de *S. aureus*

Depuis quelques années, il est apparu que l'importance des biofilms microbiens dans le milieu médical est capitale, puisque 65 % des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms **(Chicurel, 2000).** Ces infections liées aux biofilms impliquent souvent des bactéries de la flore commensale de la peau et des muqueuses comme *S. aureus*. Les staphylocoques sont responsables de la grande majorité de ce type d'infections **(Costerton *et al*., 1999; Otto, 2008)**.
Les ostéomyélites, les endocardites, les infections des plaies chroniques (notamment chez les diabétiques) et les infections associées aux dispositifs médicaux représentent les principales infections liées à la présence de biofilm de *S. aureus* **(Archer *et al*., 2011)**.

Les biofilms peuvent se former à la surface ou à l'intérieur de dispositifs médicaux implantés dans l'organisme. Les staphylocoques sont parmi les principaux germes qui peuvent contaminer ces implants médicaux qui sont à l'origine de 82% des infections nosocomiales **(Archibald, 1997)**.
Les infections associées aux biofilms des staphylocoques sont généralement homogènes et non mélangés avec d'autres espèces (**Arciola et *al*., 2005** ; **Kurlenda et Grinholc, 2012)**
Cliniquement, le biofilm n'est pas visible, sauf s'il est très épais. Il est alors souvent décrit comme un enduit visqueux à la surface d'une plaie dont le processus de cicatrisation est ralenti, et serait associé à des exsudats abondants et une prolongation de la phase inflammatoire sans signes infectieux francs **(Fromantin, 2012).**

Les plaies chroniques sont un environnement idéal pour la formation de biofilm microbien. Les tissus nécrosés et les débris permettent l'attachement des bactéries et les plaies sont vulnérables à l'infection en raison de la réponse immunitaire **(Zhao *et al*.,2013).**

IV-7-1-Organisation du biofilm chez *S. aureus*

Généralement, dans les conditions expérimentales les bactéries sous forme libre (planctonique) se multiplient favorablement sur milieux de culture qu'ils soient liquides, semi-solides ou solides, habituellement riches en éléments nutritifs nécessaires à leur croissance. Cette situation, dans le milieu naturel, n'est souvent pas accomplie et ces microorganismes adoptent alors un mode de vie en biofilm. Il est présent dans tous les environnements et est associé à des surfaces biotiques (muqueuses, dents, etc.) ou abiotiques (équipements hospitaliers, dispositifs médicaux… etc) **(Costerton, 1999; Roux et Ghigo, 2006).**

IV-7-2-Les composants du biofilm de *S. aureus*

IV-7-2-1-Microorganisme:

Chez les staphylocoques, il est rare de trouver plus d'une souche bactérienne au sein d'un même biofilm. Ceci pourrait s'expliquer par des mécanismes de quorum sensing spécifiques des staphylocoques qui inhiberaient l'expression des facteurs de virulence d'autres bactéries **(Arciola *et al*., 2005).**

A l'instar d'autres bactéries, l'ensemble des caractéristiques structurales et physico-chimiques du biofilm confère à *S. aureus* qui le compose, des propriétés spécifiques de morphologie, de croissance, de communication entre les cellules et de résistance aux biocides, distinctes de celles des bactéries planctoniques **(Roux et Ghigo, 2006).**

IV-7-2-2-Matrice

Chez les bactéries, dont *S. aureus*, cette matrice est formée de biopolymères, généralement polysaccharidiques et protéiques, excrétés à certains moments de leur cycle cellulaire **(Virginie, 2008).** Cette matrice extracellulaire fortement hydratée, appelée aussi couche muqueuse, permet la survie des micro-organismes, favorise leur nutrition et leur développement, surtout en milieu oligotrophe, en piégeant les nutriments **(Oliveira, 1992).**

Le constituant majoritaire de la matrice du biofilm est l'eau, il constitue 95-99% de la masse totale du biofilm **(Costerton *et al*., 1995; Sutherland, 2001).** La fraction microbienne représente seulement 2-5%, suivie par les exopolysaccharides (EPS) avec un taux de plus de 2% **(Sutherland, 2001).** D'autre substances tels que les acides nucléiques (ADN et ARN), les protéines, les lipides, les enzymes, les produits de dégradation et les substances provenant du milieu extérieur, peuvent être présents avec une teneur d'environ 2% de la masse totale de la matrice formant le biofilm **(Sutherland, 2001; Jass *et al*., 2003).**

IV-7-3-Résistance de *S. aureus* et de biofilm aux antibiotiques :

Les bactéries sous forme sessiles sont plus résistantes à la réponse immunitaire de l'hôte que leurs congénères planctoniques: l'efficacité de la phagocytose est donc diminuée en présence de biofilms. De plus, les bactéries associées aux biofilms sont 10 à 1000 fois plus résistantes à l'action des agents antimicrobiens que celles sous forme planctonique **(Allison *et al*., 2000)**. Trois hypothèses principales sont avancées afin d'expliciter les mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques **(Stewart et Costerton, 2001)**: La première repose sur une notion de barrière physique qui expliquerait la pénétration lente et incomplète certains antibiotiques. La seconde hypothèse est liée à l'environnement spécifique du biofilm, dont les zones les plus profondes, riches en résidus acides et pauvres en oxygène et en nutriments, pourraient gêner l'action de l'antibiotique. Enfin, la dernière hypothèse s'appuie sur les modifications phénotypiques observées dans certains biofilms et dont les micro-organismes constituants pourraient présenter des formes plus résistantes.

Cette résistance multifactorielle accrue, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.) qui modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes **(Roux et Ghigo, 2006)**. Ainsi, les propriétés pharmacodynamiques des agents antimicrobiens sont altérées en présence de biofilms, ils sont donc peu efficaces ce qui rend l'infection difficile à traiter **(Utili, 2007)**. Selon certains auteurs, l'insensibilité aux antibiotiques de la famille des β-lactamines pourrait être reliée au faible métabolisme des cellules « slow growthcells » dans les couches profondes du biofilm **(Gilbert et Brown, 1998; Fux *et al*., 2004; Fux *et al*., 2005)**.

La tolérance des biofilms aux antibiotiques pourrait également être expliquée par la notion de cellules persistantes qui sont des sous-populations très minoritaires de bactéries hyper-résistantes ayant survécu à l'action d'un antibiotique **(Keren *et al*., 2004; Lewis, 2008; Singh *et al*.,2009)**.

S. aureus a développé des résistances à quasiment tous les antibiotiques mis sur le marché. Les mécanismes impliqués comprennent la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques et des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie **(Tableau 02) (Corne, 2004).**

Tableau2 : Mécanismes de résistance des staphylocoques aux antibiotiques

Antibiotiques	**Mécanismes de résistance**	**Références**
Les Beta lactamines	une production d'enzymes (pénicillinases) ou par modification de la cible PLP	**[(Leclercq,2002) ; (Corne, 2004) ; (Eveillard, 2007)].**
Les Glycopeptides	épaississement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé	**[(Fauchere et Avril ,2002) ; (Corne, 2004)].**
Les Aminosides	production d'enzymes à partir d'un plasmide R. Ces enzymes sont de trois catégories : les phospho transférases, les adenyltransférases et les acetyltransférases	**(Tchougoune, 2007)**
Les Macrolides, Lincomycines, Streptogramines (MLS)	modification de la cible	**(Merlet, 2010)**

Les Tetracyclines	sécrétion d'une protéine qui empêche la pénétration intrabactérienne de l'antibiotique	**(Tchougoune, 2007)**
Les Fluoroquinolones	une modification de la cible	**(Quincampoix et Mainardi ,2001)**

V: Les méthodes de détection de biofilm

Il existe différentes méthodes pour détecter la production d'un biofilm, parmi lesquelles ; la méthode de Plaque de culture de tissus (TCP), la méthode en Tube (TM), la culture sur milieu rouge Congo (RCA) et le Biofilm Ring Test (BFRT).

V-1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

La méthode de plaque de culture de tissus (TCP) décrit par **O'Toole*et al*., (2000)** permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm **(Bellifa, 2014).** Les biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques à 96 puits.

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu Bouillon infusion cœur cervelle (BHIB), les puits d'une microplaque de 96 puits sont inoculés avec des bactéries. Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec de tampon phosphate salin (PBS) **(Figure 6).**

Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 0,1%. En fonction de la lecture des densités optiques (DO) de la phase biofilm, les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm **(Mathur *et al*., 2006 ; Afreenich *et al*., 2011 ; Bellifa, 2014).**

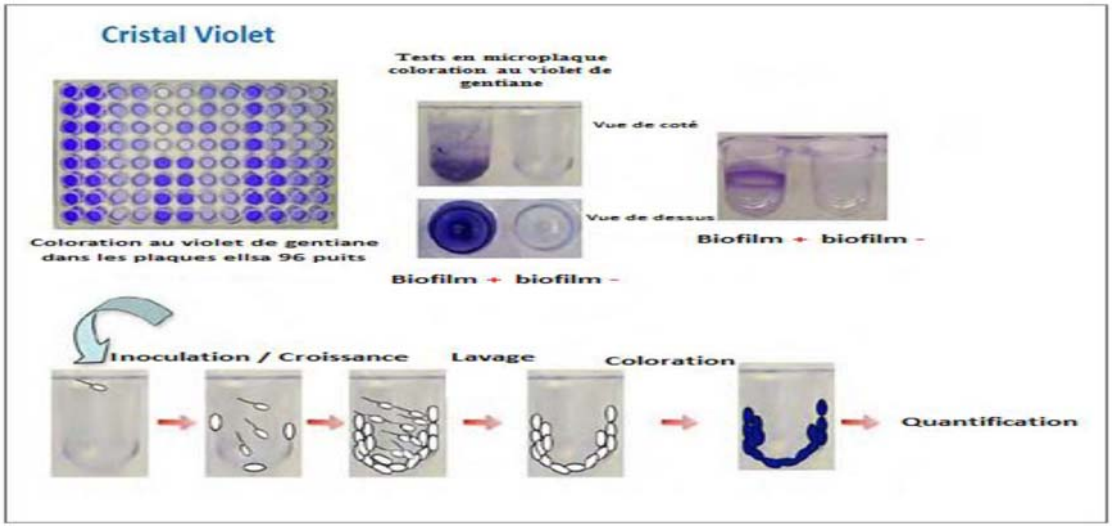


Figure 06. Formation de biofilm en microplaque **(Bellifa, 2014).**

V-2. La méthode en tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par **Christensen *et al*.,(1982) (Nagaveni et *al*., 2010 ; Rewatkar et Wadher, 2013; KaraTerki, 2014)**.

A partir d'une culture de 18-24 heures, une colonie est ensemencée dans de BHIB supplémenté de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes sont lavés avec du PBS puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le CV **(Figure 7).**

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube **(Mathur *et al*., 2006 ; Alnnasouri, 2010 ; Djelloul Daouadji, 2010 ; Taj,2012 ; Bellifa, 2014).**

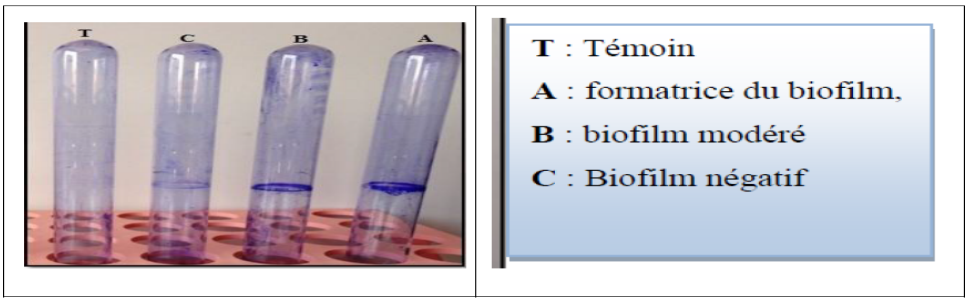


Figure 07. Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM **(Bellifa, 2014).**

V-3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

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

(Figure 8). Sur ce milieu les souches exprimant le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge pour les souches PIA négatives. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir **(Mathur *et al*., 2006 ; Afreenich *et al*., 2011 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2014).**

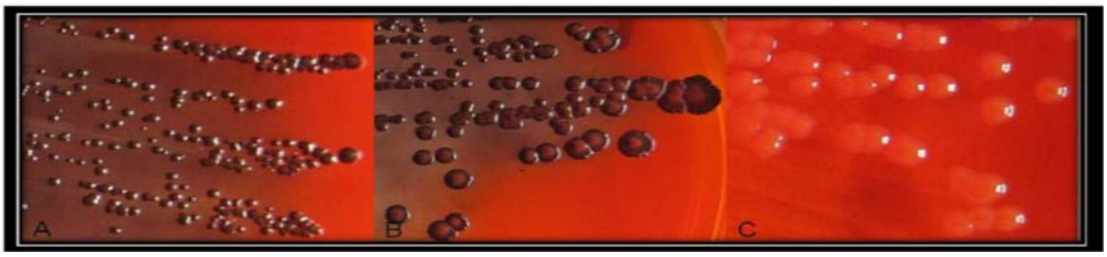


Figure 08. Culture sur la gélose Rouge Congo **(Hou *et al*., 2012).**

(A) : RCA-positive souche de *S. epidermidis* (colonies noires), **(B) :** RCA-positive souche de *S. aureus* (colonies noires), **(C) :** RCA-négative souche de *P. aeruginosa* (colonies rouges).

V-4.Le Biofilm Ring Test (BFRT)

Une nouvelle technique de détection et d'évaluation quantitative des biofilms: le Biofilm Ring Test (BFRT) technique décrite par **Chavant et *al*. (Liesse Iyamba, 2012 ;Nagant, 2013)** et développée par la Société Biofilm Control. Cette méthode devait permettre de suivre la formation de biofilm d'une façon simple et rapide, sans étapes de lavage ni de coloration **(Perrin, 2009).**

Elle permet de suivre de façon simple et rapide l'immobilisation de billes magnétiques par les cellules bactériennes adhérant au fond du puits. Plus les billes seront piégées, moins elles se déplaceront dans le champ magnétique et moins elles se regrouperont au centre du puits. L'immobilisation des billes est secondaire soit au fait qu'elles sont «piégées» par des bactéries qui adhèrent au fond du puits, soit au fait que les propriétés rhéologiques du milieu sont modifiées **(Liesse Iyamba, 2012 ; Nagant, 2013) (Figure 9).**

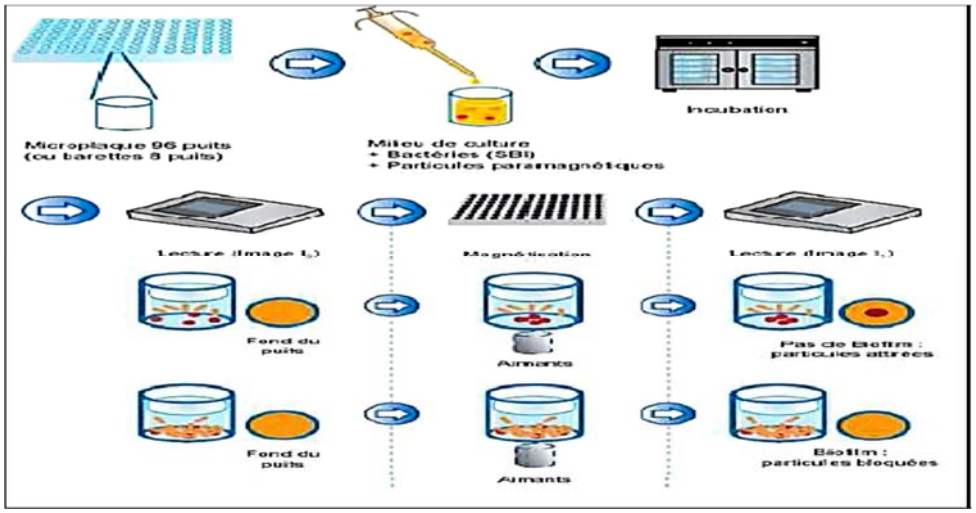


Figure 09. Le principe de Biofilm Ring Test **(Perrin, 2009).**

Partie Expérimental

Matériel et méthodes

I-Matériels

I-1- Les milieux de culture

-Bouillon BHIB

-Gélose Columbia

-Gélose Chapman

-Gélose Muller Hinton

-Rouge Congo

I-2- Matériels d'identification biochimique

-API Staph (Biomérieux, France)

- **Réactifs :** ZYM A (Réf. 70 494), ZYM B (Réf. 70 493),
VP 1 +VP 2 (Réf. 70 422), NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442).

I-3- Disques d'antibiotiques

- Kanamycine (30µg)
- Vancomycine (30µg)
-Ofloxacine (5 µg)
-Chloramphénicol (30 µg)
-Erythromycine (15 µg)
-Pristinamycine (15 µg)
-Clindamycine (2 µg)
-Gentamicine (10 µg)
-Pénicilline (10 Ul)
-Oxacilline (1 µg)
-Amikacine (30 µg)
-Fosfomycine (50 µg)
-Tétracycline (30 µg)
-Teicoplanine (30 µg)
-Triméthoprime+sulfaméthoxazol (1.25/23.75 µg)

I-4- Matériel d'étude du biofilm

- Microplaques de titration (96 puits)
-Vortex
-Lecteur de microplaques

I-5-Autre Matériel

-Ecouvillons stériles

-Anse de platine

-Pipette pasteur

-Boites de pétri

-Tubes à essais

-Tubes à hémolyse

-Lames et lamelles

-Etuve

-Bec bunsen

-Vortex

-Autoclavage

-Micropipette

-microscope

-balance

-plaque chauffent

I-6- Autre produits

-Eau oxygénée

- Crystal violet

-Eau distillée

-Violet de gentiane

-Lugol

-Fuchsine

-Ethanol

-Eau physiologique

-Alcool

II. Méthodes

II-1-Période et lieu d'étude

Notre travail a été réalisé au laboratoire de la faculté des sciences-Université de Médéa-durant la période allant de 10 mars à 29 mai 2018.

II-2- Objectif d'étude

- **Objectif principal**

Cette étude a pour objectif principal l'évaluation de formation de biofilm de *staphylococcus aureus* associés aux plaies.

- **Objectif secondaire**

-L'isolement et l'identification phénotypique d'une collection de souches de *Staphylococcus aureus* provenant de plaies cutanées.

- Le suivi de la cinétique de formation de biofilm des isolats de *S. aureus.*

II-3- Prélèvement

- **Echantillonnage**

L'écouvillonnage de la plaie c'est la méthode la plus utilisée **(Lavigne *et al*., 2007)**. Elle consiste à faire passer une tige de coton au sein de la plaie, dans un mouvement en Z combiné à une rotation. Il est préférable de ne pas prélever sur les bords de la plaie.

- **Acheminement des prélèvements**

Les écouvillons, contenant les échantillons à analyser, sont transportés au laboratoire à une température ambiantedans un délai ne dépassant pas les deux heures **(photo 01).**

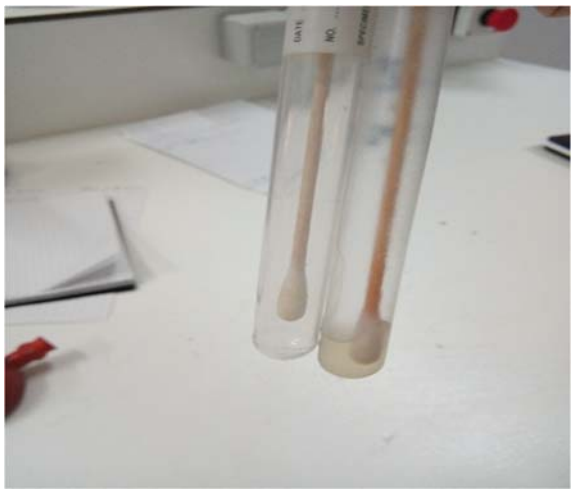


Photo personnelle 01 : Prélèvement de pus par écouvillonnage.

- **Lieux de prélèvement**

  Les prélèvements ont été effectués dans les salles de soins des polycliniques d'Ain el-Mordj et de nouveau pôle, et dans le service de traumatologie à l'hôpital de Médéa et de Beni-slimane.

  Les prélèvements concernent : les plaies du cancer de la peau,les plaies de pied diabétique, les plaies opératoires, plaies ombilical.

II-4- Analyse des prélèvements

- **L'enrichissement**

  L'enrichissement des microorganismes est réalisé en mettant chaque écouvillon dans un tube contenant le bouillant BHIB et laisser incubé 24h.

- **Isolement et purification**

L'isolement, de diverses espèces bactériennes présentes, est réalisé sur deux milieux gélosés préalablement coulés en boite de Pétri à savoir : le milieu Chapman, et la gélose au sang.

Les tubes récupérés, après enrichissement, sont par la suite soumis à un vortexage. Après homogénéisation, l'ensemencement des milieux cités, est effectué en surface, en stries serrées,avec une goutte de la suspension. Les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

II-5- Identification phénotypique des isolats

L'identification comporte une série d'étape, se succédant le plus souvent dans un ordre déterminé ; les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (la coloration de Gram , catalase) et par le système API Staph (BioMérieux) pour S.*aureus*.Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

II-5-1- Examen macroscopique

Cet examen, appliqué principalement sur la gélose Chapman et la gélose au sang (cuit et frai), est basé sur la recherche essentiellement des caractéristiques suivantes : la couleur, pigmentation, la forme, l'aspect de surface, l'aspect des bords de colonies, la consistance, l'opacité et la fermentation du mannitol.

II-5-2- Examen microscopique:

- **Examen après coloration de Gram :**

L'examen microscopique après coloration de Gram, permet non seulement d'observer la morphologie des cellules et leurs modes de regroupement, mais aussi de différencier ces bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif. La coloration elle est effectuée en plusieurs étapes :

- La préparation du frottis mince.
- La coloration (coloration primaire, mordançage, décoloration et coloration secondaire).
- Observation microscopique (à immersion X 100).

II-6- Identification biochimique

II-6-1- Tests d'orientations

- **Recherche de la catalase**

-Technique

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques. A partir d'un isolement, une petite quantité de culture bactérienne est prélevée; puis placée sur une lame, on fait réagir la colonie dans 1 goutte de peroxyde d'hydrogène (*H2O2*) **(Garnier et Denis, 2007)**.

-Lecture

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

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + 1/2\ O_2$$

Ce test, peut être réalisé en tube contenant 0.5 ml de H2O2. On prélevées des colonies et introduites dans le tube. Le résultat et identique à celui obtenu lors du test sur lame **(Aouati, 2009 ; Chaala, 2013).**

- **Recherche de la coagulase en tube**

Technique

L'identification de *Staphylococcus aureus* est réalisée par la mise en évidence de la coagulase. Cette dernière est la seule espèce au sein du genre *Staphylococcus* possédant une coagulase.

Une suspension homogène est préparée à partir des colonies isolées et identiques sur milieu Chapman. 1 ml de cette suspension sont alors mélangés, dans un tube à hémolyse, avec 1 ml de plasma humain. Le tube est incubé à 37°C et observé après 2 heures. Ce test permet de différencier entre *S. aureus* (*S.* doré) à coagulase positive, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus epidermidis* (*S.* blanc) à coagulase négative **(CHATANE et ZIADI, 2017).**

Lecture

La coagulation se manifeste par la prise en masse du plasma.

II-6-2- Identification par la galerie (API®*Staph)*

API®*Staph BioMérieux* est un système standardisé pour l'identification des genres Staphylococcus, Micrococcus. Ces galeries comportent 20 tests biochimiques permettant l'identificationdes espèces de Staphylococcus. Les tests étudiés par cette galerie sont :
La fermentation de différents sucres ou polyalcools ; la recherche de nitrate réductase, de phosphatase, d'arginine dihydrolase et d'uréase **(Chaala, 2013).**

- **Technique**

-Réunir fond et couvercle d'une boite d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-Un inoculum bactérien d'opacité égale à 0,5 de McF est préparé avec l'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure de 18 heures sur gélose au sang. À l'aide d'une pipette, remplir l'eau physiologique ensemencée dans les tubes de la galerie à l'exception des cupules sans pour autant dépasser le niveau des tubes.

-Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE, en remplissant leurs cupules d'huile de paraffine ensuite renfermer la boite d'incubation et incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture :**

  La lecture peut s'effectuer directement par rapport aux résultats du tableau d'identification, ou bien après transformation de ces résultats en code chiffré dont la signification est donnée par un inde numérique (API web) **(Murray, 2003)**.

  -Par le catalogue analytique **(voir annexe 02)**

  -Par un logiciel d'identification

II-7- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques (ATB) de *S. aureus* a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM) 2014.

- **Préparation de l'inoculum :**

  L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 heures. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine, et déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %.

- **Ensemencement :**

  Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension, 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 de milieu Mueller-Hinton (MH), de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux 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.

- **Dépôt des disques d'antibiotiques :**

  Les disques d'ATB sont appliqués à l'aide d'une pince stérile. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.

- **Incubation :**

  Les boîtes sont, ensuite, incubées en position retournée pendant 18 heures à 37°C.

- **Lecture et interprétation :**

Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'ATB, sont mesurés. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations SFM **(Société Française de Microbiologie, 2011) (voir annexe 03),** Les antibiotiques testés sont définies selon la bactérie recherchée. Ainsi, les ATB testés pour chaque bactérie sont rapportés dans le **Tableau 03.**

Tableau 03 : Liste des antibiotiques testés.

Bactéries	ATB	Sigle	Charge (µg)	Famille
S.aureus	Pénicilline	PEN	10 µl	β Lactamines
	Oxacilline	OX	01	
	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole	SXT	1.25/23.75	SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME
	Chlorampénicol	CHL	30	Phénicoles
	Vancomycine	VAN	30	GLYCOPEPTIDES
	Amikacine	AK	30	AMINOSIDES
	Gentamicine	GEN	10	
	Clindamycine	CMN	02	LINCOSAMIDES
	Pristinamycine	RP	15	STREPTOGRAMINES
	Erythromycine	ERY	15	MACROLIDES

Bactéries	ATB	Sigle	Charge (µg)	Famille
S.aureus	Fosfomycine	FSF	50	DIVERS
	Oflaxacines	OFX	05	
	Kanamycines	K	30	
	Tetracyclines	TET	30	
	Teicoplamines	TEC	30	

II-8-Étude de la formation de biofilms de *S. aureus*

II-8-1-La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime est donnant des colonies noires sur milieu Rouge Congo Agar (RCA), contrairement aux colonies non productrices qui restent rouges **(Rewatkar et Wadher, 2013)**.

- **Technique**

  La formation de biofilm a été recherchée sur le milieu Rouge Congo. Ce milieu a été préparé en additionnant 0,8 g de Rouge Congo et 50 g de saccharose à 1 L de gélose coeur-cervelle.

  -Ensemencer en stries une colonie de *S.aureus* à la surface d'une boite de gélose Rouge Congo (RCA).

  La lecture a été faite après 24 heures d'incubation à 37°C **(Touati et *al*.,2007-).**

- **Lecture**

  Les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (**Nasr*et al*., 2012**).

II-8-2- La méthode de microplaques de titration

Les microplaques utilisées étaient en polystyrène comportant 96 puits sur lesquelles les bactéries vont adhérer et former un biofilm **(photo 02).**

La méthode des microplaques de titration au cristal violet, mise au point par O'Toole et Kolter (1998) est une technique très utilisée, pour la formation de biofilms C'est une technique colorimétrique basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm. En effet cette technique de coloration permet de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet, alors que les surfaces abiotiques ne sont pas colorées (**Peeters *et al..,2008).*** On a effectué la technique de microplaque de titration en utilisant deux milieux (BHIB et BHIB additionné de 2% de saccharose) pour tester l'effet de saccharose sur le pouvoir de formation de biofilm.

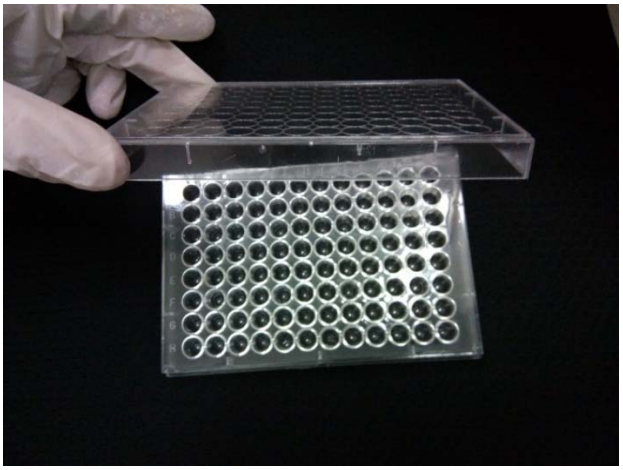


Photo personnelle 02: Microplaque de titration.

- **Technique**

  - A partir des colonies isolées, effectuer des cultures d'une nuit dans les milieux BHIB et BHIB+2% saccharose.
  - Après incubation, des dilutions appropriées sont effectuées afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à 10^8 UFC/mL par ajustement de l'absorbance à 0.5 McFarland à une longueur d'onde de 600nm.
  - Les puits stériles d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont remplis avec 150µL de cette suspension bactérienne.
  - Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

- Les puits sont lavés trois fois avec 0,2 ml de PBS afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) **(figure 10)** pendant 10 min (le cristal violet est une petite molécule qui diffuse à travers les membranes bactériennes et pénètre à l'intérieur des bactéries pour se complexer aux molécules chargées négativement)

- L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée stérile et les plaques sont laissées à température ambiante pour séchage **(Stepanovic *et al.*,2000) (photo 03).**

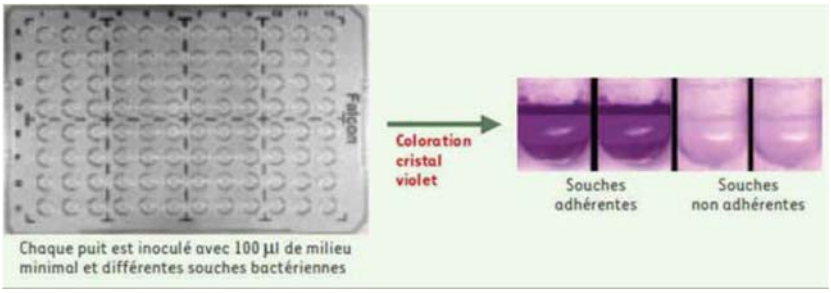


Figure 10 : Principe de la mesure de la biomasse par la méthode de TCP (**Filloux et Vallet, 2003**).

-introduire dans chaque puit 200µl de l'éthanol et la laisser 15 mn.

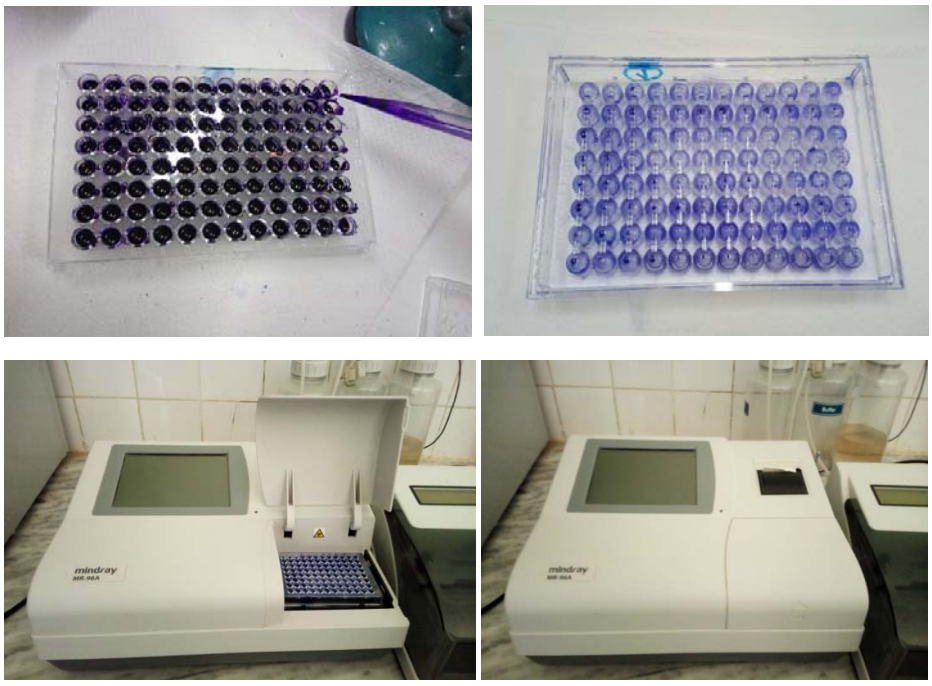


Photo personnelle 03: Détection et lecture de biofilm par méthode TCP.

1 : Coloration par CV.

2 : Rinçage par l'eau distillé stérile.

3 : Récupération de biofilm par l'éthanol.

4 : un lecteur de microplaques (mesurer la DO).

- **Lecture**

  La lecture de densité optique se fait à l'aide d'un lecteur de microplaques **(bioTek, Allemagne)** à 630 nm **.**

- **Calcul de la valeur seuil de DO minimale et DO maximale**

  D'après Al-Ahmad et *al.* (2014), les valeurs seuil de DO minimale (DO Min) et DO maximale (DOmax) ont été calculées selon les formules suivantes:

  DO Min = DO moyenne du témoin + (3 · δ de DO du témoin).

  DO Max = 3 × DO Min

  δ : l'écart type.

  Selon ces deux valeurs seuils, les souches bactériennes isolées ont été classées en trois catégories:

  C1 : souches non productrices de biofilm si DO< DO Min

  C2 : souches modérément productrices de biofilm si DO Min<DO< DO Max.

  C3 : souches fortement productrices de biofilm si DO>DO Max.

II-8-3- La méthode en tube TM (Christensen, 1982)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par **Christensen *et al*., (1982).**

- **Technique :**

  A partir d'une boite de culture 18-24 heures, ensemencer une colonie dans 10 mL de BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis incube à 37°C pendant 24 h. Les tubes ont été lavés avec du PBS (pH=7,3) puis séchés. Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet(0,1%) pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée **(Mathur *et al*., 2006).**

- **Lecture**

  La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le bas du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. La formation de biofilms est notée comme de 0 pour absent, + pour modéré et +++ pour fort **(Stepanovic*et al*., 2000).**

Résultats et Discussion

III- Résultats et discussion

III-1-Prélèvement

Durant notre période d'étude, 21 prélèvements (08 plaies post-opératoires ; 02 brulures ; 02 abcès ombilical ; 08 plaies des pieds diabétiques, 01 cancer de la peau) ont été collectés aseptiquement au niveau des services: chirurgie générale de l'hôpital de Beni-Slimane ; l'hôpital de Médéa et aux salles de soin des poly cliniques d'Ain el-mordj et de nouveau pôle de Médéa **(tableau04).**

Tableau04 : Répartition des prélèvements selon les types des plaies.

Type des plaies	Nb prélèvements	Pourcentage (%)
Brulures	02	9.52%
Cancer de la peau	01	4.76%
Post-opératoire	08	38.1%
Ombilical	02	9.52%
Pied diabétique	08	38.1%
Total	21	100%

III-2-Analyse des prélèvements

La mise en culture de divers prélèvements sur les milieux solides (Chapman et gélose au sang frais) a révélé la présence de plusieurs espèces bactériennes parmi lesquelles 10 souche présentes l'aspect macroscopique caractéristique du genre des les *Staphylococcus aureus* qui font l'objectif de notre travaille.

Bien que 52% des prélèvements ont donné naissance à un trouble visible. Ces souches présentant des caractères différents et n'appartiennent pas aux genres recherchés ce qui nous a incité à abandonner l'identification.

III-2-1-Identification des souches isolées

III-2-1-1-Aspect des colonies

Sur les deux milieux de cultures (Chapman, gélose au sang), les colonies présentent l'aspect macroscopique caractéristique du genre *Staphylococcus aureus* ont été prélevées.

Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté **(Photo Personnelle 4.).** Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 mm de diamètre après 24 heures d'incubation à 37°C.

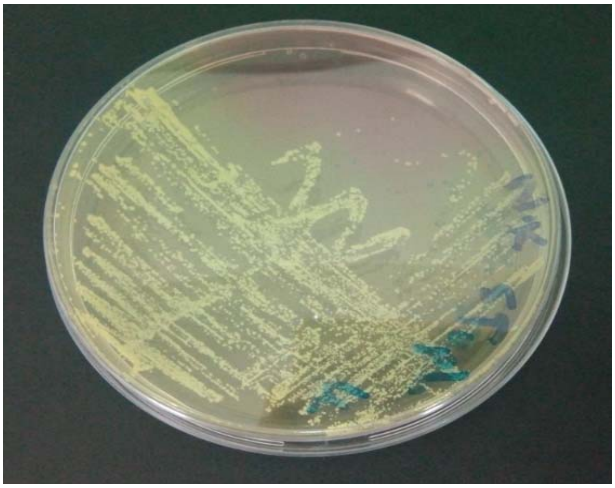


Photo personnelle 04: Colonie de *S. aureus* sur milieu chapman.

Sur gélose au sang cuit et frais, les colonies ont une couleur blanche ou jaune pigmentée, d'un diamètre variant entre 1 à 3 mm de diamètre, après 24 heures d'incubation à 37°C **(photo 05).**

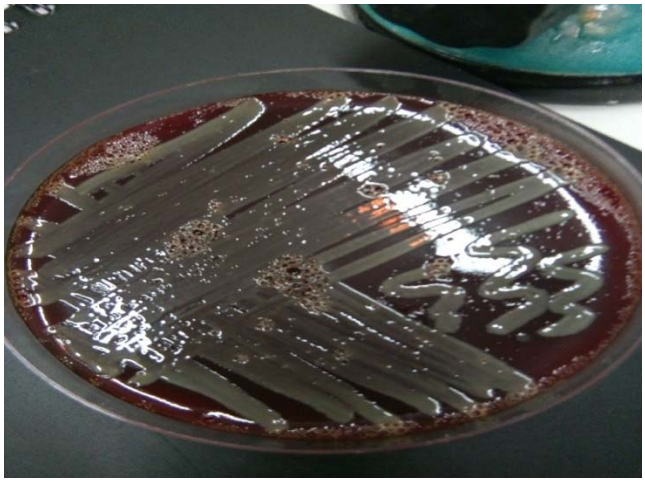


Photo personnelle 05 : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* isolées sur gélose au sang.

III-2-1-2-Aspect microscopique

- **Coloration de gram**

La coloration de Gram des 10 souches isolées a mis en évidence : des cocci en grappe de raisin, colorés en violet **(Photo 06).**

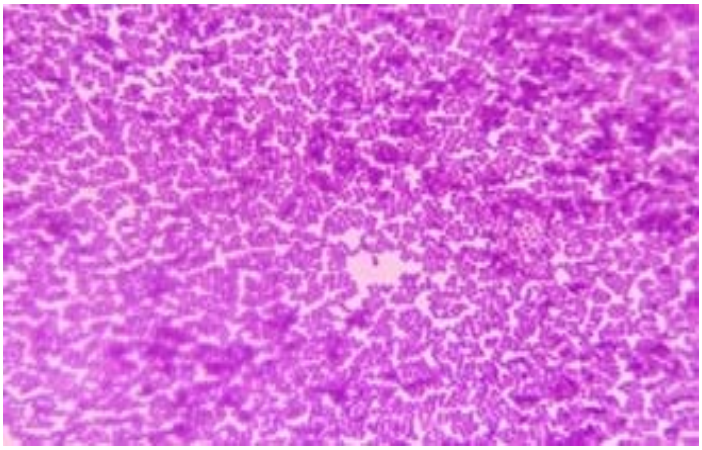


Photo perssonnel 06 : Coloration de gram (objectif x 100).

III-2-3-Résultats de l'identification biochimique des isolats

III-2-3-1-Résultats des tests d'orientation

- **Test catalase**

Toutes les cocci à Gram positif, testés pour la production d'une catalase, décomposent l'eau oxygénée, en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui traduit par le dégagement des bulles des gaz (effervescence) **(photo 07).**



Photo Personnelle 07 : Production de catalase par les cocci à gram positif isolés.

- **Test de coagulase libre**

  Les cocci à Gram positif, catalase positive, testés pour la production d'une coagulase, présentent un phénotype variable **(Photo 08).**

  10 souches à coagulase positive : *S. aureus.*

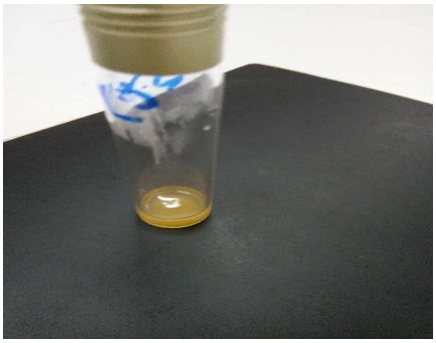


Photo personnelle 08: Résultat du test de coagulase libre.

III-2-4-Tableau récapitulatif des résultats de l'identification des *Staphylococcus aureus*

Tableau05 : Résultats de la pré-identification par les techniques Microbiologiques standards

Caractères principales	***Coloration de Gram***	***Test catalase***	***Test coagulase***
10 souches sont :	Cocci à Gram positif, colorés en violet, regroupés en grappes de raisin	Catalase positive	coagulase positive

III-2-5- Résultats de l'identification biochimique par API® StaphBioMérieux®

Le système API®Staph (BioMérieux) nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de dix souches de*Staphylococcus aureus.*

La lecture et l'identification des souches est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification apiweb®API 20Staph.



Photo personnelle 09 : Résultat d'une galerie de *S. aureus* API® Staph

Tableau 06 : Les tests biochimiques de *S.aureus*

Tests	**0**	**GLU**	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
S.aureus	Témoin	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-

III-2-6- La fréquence des *Staphylococcus aureus*

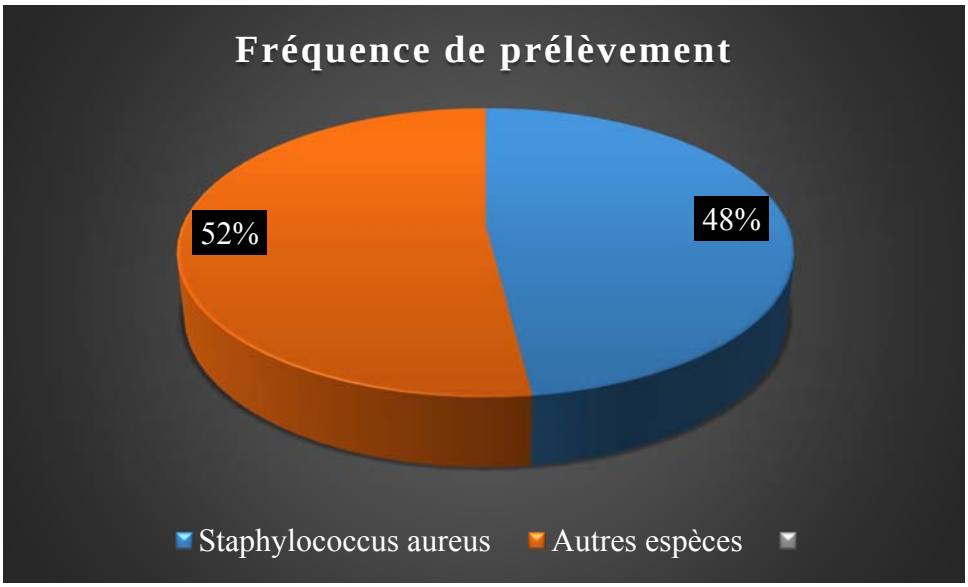


Figure11 : Fréquence de prélèvement positif à *S.aureus*.

06 souches ont été isolées à partir des plaies de pied diabétique ; 02 souches ont été isolées à partir des plaies post-opératoires ; 02 souches ont été isolées à partir des plaies ombilicales.

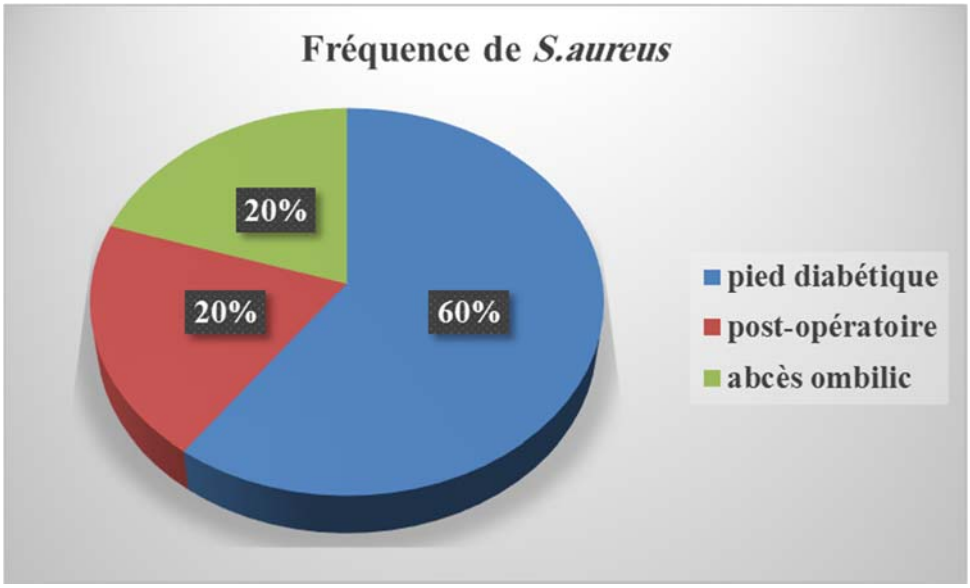


Figure12: Fréquence de *S.aureus* dans les différents types des plaies.

III-3-Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques:

Les résultats de l'antibiogramme effectué pour les 10 souches de *Staphylococcus aureus* sont illustrés dans le tableau suivant **(tableau 07).**

Tableau 07: Résultats d'antibiogramme pour les 10 souches de *Staphylococcus aureus* isolées

Famille	Antibiotique	Nombres des souche et %					
		Résistance		Intermédiaire		Sensible	
		N	%	N	%	N	%
β–Lactamines	Pénicilline (PEN)	07	70%	00	00%	03	30%
	Oxacilline (OX)	05	50%	00	00%	05	50%
AMINOSIDES	Amikacine (AK)	00	00%	01	10%	09	90%
	Gentamicine (GEN)	00	00%	01	10%	09	90%

MACROLIDES	Erythromycine (ERY)	02	20%	01	10%	07	70%
LINCOSAMIDES	Clindamycine (CMN)	02	20%	01	10%	07	70%
STREPTOGRAMINES	Pristinamycine (RP)	02	20%	01	10%	07	70%
GLYCOPEPTIDES	Vancomycine (VAN)	00	00%	00	00%	10	100%
SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole (SXT)	05	50%	00	00%	05	50%
Phénicoles	Chloramphénicol	00	00%	00	00%	10	100%
DIVERS	Fosfomycine(FSF)	01	10%	00	00%	09	90%
	Oflaxacines (ofx)	05	50%	00	00%	05	50%
	Kanamycines (k)	05	50%	00	00%	05	50%
	Tetracyclines (TET)	00	00%	01	10%	09	90%
	Teicoplamines (TEC)	00	00%	00	00%	10	100%

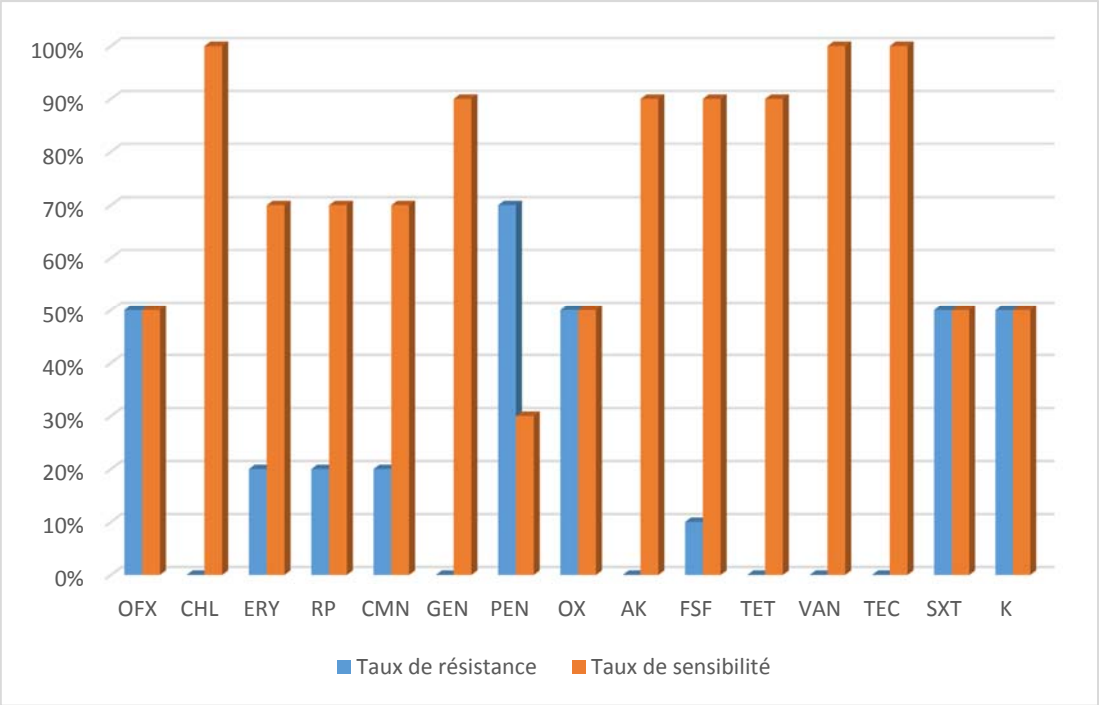


Figure13 : Les taux de résistance et de sensibilités de *s.aureus* isolés à partir des plaies.

Les dix souches ont présenté des taux élevés de sensibilités à toutes les familles d'antibiotiques sauf aux β–Lactamines et Sulfamides-trimethoprime.

Nous signalons que ces souches ont montré un pourcentage de sensibilités ,assez élevé vis-à-vis des Chloramphénicol, Vancomycine et Teicoplamines (TEC) avec un taux de 100% , Tetracyclines (TET), Fosfomycine(FSF), Amikacine (AK) et Gentamicine (GEN), avec un taux de 90% et Erythromycine (ERY), Clindamycine (CMN) et Pristinamycine (RP), avec un taux de 70%.

Ces souches ont montré un taux de résistance assez élevé vis-à-vis à une seule antibiotique : pénicilline avec un taux de 70%. En plus, 50% des souches sont résistantes à l'Oxacilline (OX), le Triméthoprime/sulfaméthoxazole (SXT), l'oflaxacine (OFX) et à la kanamycine (K).

En effet, l'ensemble des ATB suivants : VAN (Glycopeptides), CHL (Phénicol) et TEC (teicoplamine), garde une bonne activité sur les souches de *S.aureus.* (**figure 10)**

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Ha Van (2008),** représentant le spectre des principaux antibiotiques utilisés dans les infections du pied diabétique, qui ont indiqué que le Staphylocoque

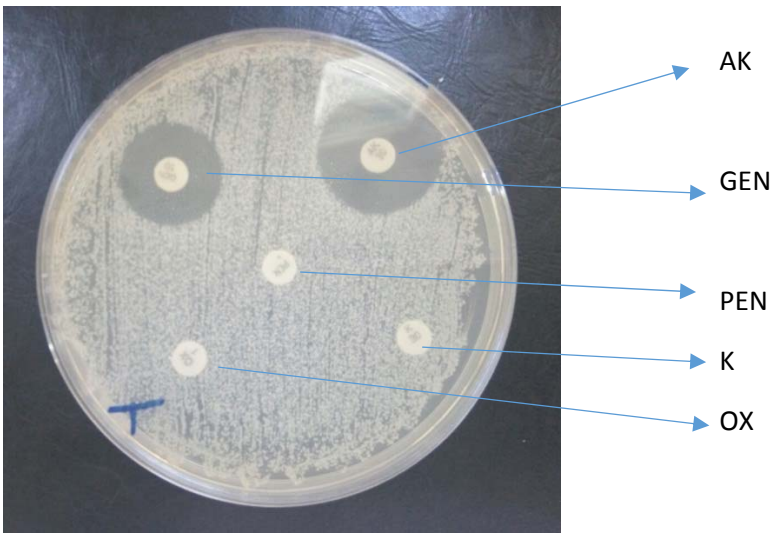
doré est résistant à deux antibiotiques OX et à IPM, appartenant aux bétalactamines**(Ha Van, 2008)**.

Le pourcentage de résistance élevé et l'apparition des souches résistantes à la pénicilline et à l'oxacilline est probablement dû à la pression de sélection exercée par ces molécules. Le risque de sélection de bactéries résistantes est variable pour chaque antibiotique, chaque espèce bactérienne, chaque complexe antibiotique **(Bergogne ; 1995).**

Aucune souche résistante à la vancomycine n'a été détecté dans notre étude, ce résultat est comparable à celui obtenu par **Abdallah *et al*., en (2011)** qui avait également trouvé que la vancomycine était l'antibiotique le plus efficace sur les *staphylococcus aureus.*

Conformément à plusieurs auteurs, les antibiotiques doivent traverser une épaisse couche constituée d'exopolysaccharides , d'ADN et de protéines afin de pouvoir atteindre leur cellules cibles **(Anderson et O'Toole ,2008)**, les antibiotiques de la famille des Pénicillines pénètrent difficilement dans les biofilms constitués de staphylocoques **(Stewart et Costerton ,2001).**

Les staphylocoques ne sont pas tués par ces concentrations et sont alors amené à établir des résistances car l'utilisation excessive et inadaptée des antibiotiques est la principal responsable de l'émergence des résistances **(Collomb, 2011).**



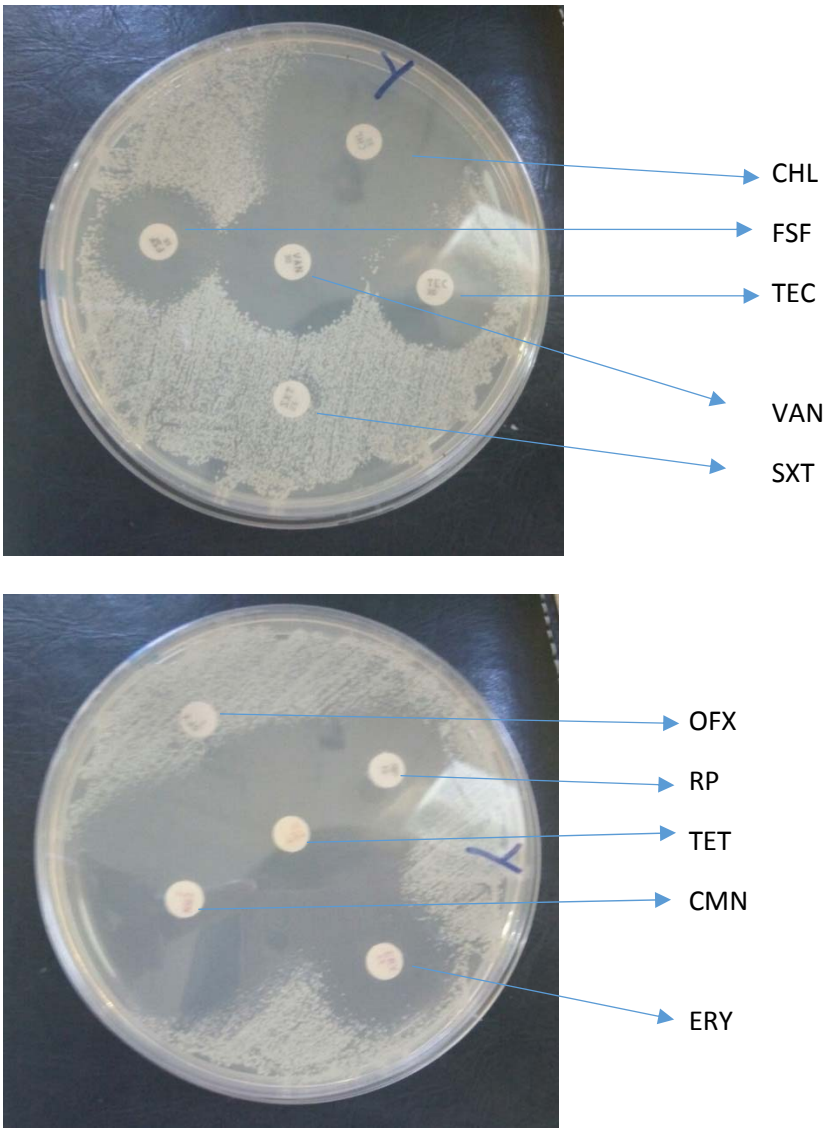


Photo personnelle 10 : Effect des disques d'antibiotique sur quelques souche de *Staphylococcus aureus* (original) (y).

III-4- Résultats de l'étude de la formation de biofilms chez *S. aureus :*

Dans le présent travail, dix souches cliniques de *S. aureus* préalablement isolées et identifiées ont été testé afin d'évaluer et de comparer leurs capacités à produire des biofilms dans le but de comprendre leurs persistances dans les plaies infectées. Ces études sont importantes pour le développement des stratégies de contrôle des biofilms indésirables.

L'étude phénotypique de la production de biofilms, par ces souches, a été effectuée par trois méthodes à savoir la méthode utilisant la gélose Rouge Congo et et la méthode de formation sur microplaques à 96 puits la méthode en tube (TM). **(Freeman *et al.*, 1989 ; Mathur *et al.*, 2006)**.

Par ailleurs, la méthode standard de coloration au CV, a permis une évaluation quantitative (TCP), et qualitative (TM) de la formation du biofilm. ainsi que le suivi de la cinétique de la formation de biofilms de *S. aureus* **(Djordjevic *et al.*, 2002)**.

III-4-1- Technique Rouge Congo :

Les dix souches, ont été testées pour mettre en évidence leurs capacités à former des biofilms par la méthode RCA dont les résultats sont montrés dans les tableau suivant **(tableau08) :**

Tableau 08 : Fréquence des souches formatrices de slime dans les différents types des plaies (méthode Rouge congo)

Méthodes RCA	Souches isolés d'PO	Souches isolés d'PD	Souches isolés d'PM
Souches formatrices de biofilm	00 (00%)	03 (50%)	02 (100%)
Souches non formatrices de biofilm	01 (50%)	01 (16.7%)	00 (00%)
Souches modéré de formation de biofilm	01 (50%)	02 (33.3%)	00 (00%)
Total	02 (100%)	06 (100%)	02 (100%)

Tableau 09 : Résultats de pourcentage des souches formatrices, modérément formatrices, non formatrices de slime par la méthode RCA

souche	Formatrice	Modérément formatrice	Non formatrice
Nombre des souches	5	3	2
pourcentage	50%	30%	20%
total	10		

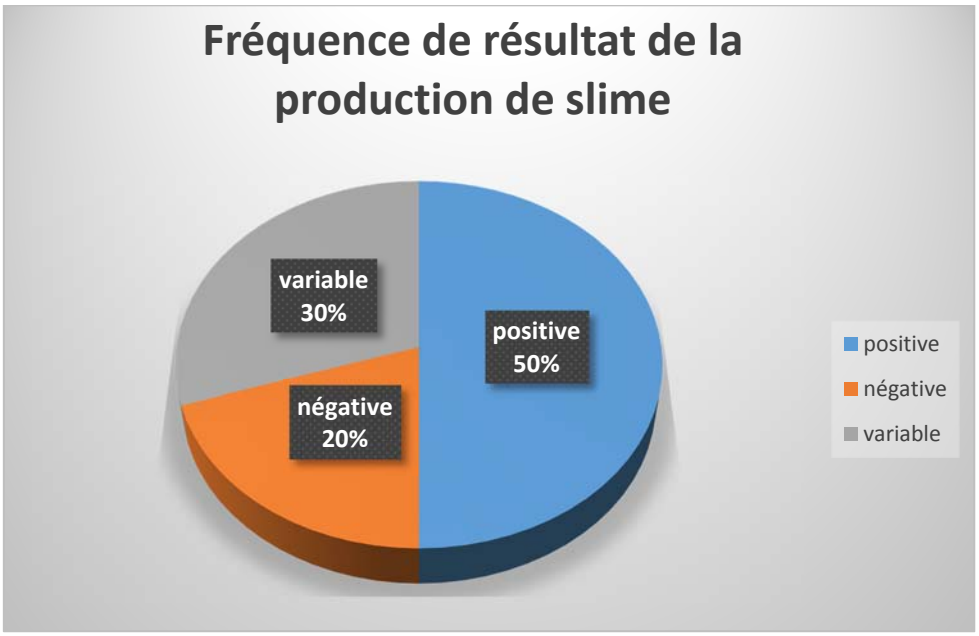


Figure14 : Fréquence de résultat de la production de slime par la méthode RCA. Positive : formatrice ; négative : non formatrice ; variable : modérément formatrice.

L'aspect des trois phénotypes (positive, négative, variable) observés sur gélose Rouge Congo est présenté dans la figure suivante (figure)



A B C

Photo pesonnelle 11 : Dépistage de la production de biofilm par la méthode en Rouge Congo Agar (RCA) . A :Modéré B :Elevé, A :Modéré, C :Non producteur de biofilm(original).

La recherche de la production de slime sur RCA a révélé, qu'après 24 heures d'incubation, 50% des souches ont donné naissance à des colonies noire et sont donc considérées comme productrices de slime, 20% des souches donné des colonies rouge et sont donc considérées

comme non productrices de slime et 30% considérées comme des souches moyennement formatrice de slime.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Zmantar *et al.* (2010)** traitant la caractérisation phénotypique de la production de biofilm de *S. aureus* et qui ont révélé que 56,5 % de souches sont productrices de slime. Alors que l'étude de **Bose *et al.* (2009)** a rapporté que exclusivement 32, 96 % de *S. aureus* sont productrices de slime.

Le PIA est sans doute un élément important dans la formation du biofilm mais il n'est cependant pas indispensable. *S. aureus* est capable de produire du biofilm selon des voies indépendantes du PIA. En l'absence de ce dernier, l'adhésion cellulaire se fait essentiellement par le biais de protéines dont la nature varie d'une souche à l'autre. **(CHATANE et ZIADI, 2017).**

III-4-2- Formation de biofilms en microplaques

Afin de quantifier la capacité de production de biofilms par les souches étudiées, l'essai de coloration au CV est souvent préféré en raison de sa simplicité et sa fiabilité. Cette méthode permet une culture et une quantification *in vitro* de biofilms bactériens.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de biofilm produite. Une mesure de la DO permet d'avoir une approche quantitative sur la capacité d'une bactérie à produire un biofilm **(Vieu, 2014)**.

III-4-2-1-Résultats de Formation de biofilm par TCP sans supplément (2% saccharose) :

Les 10 isolats identifiés ont été testé pour leur capacité à produire du biofilm *in vitro*. Ceci par la méthode quantitative de coloration au cristal violet sur microplaque 96 puits en polystyrène.

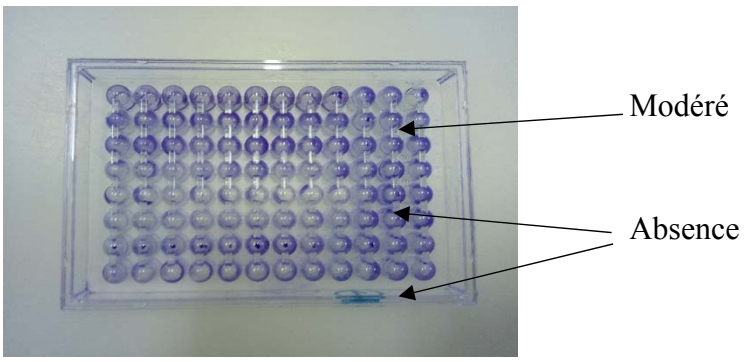


Photo personnelle 12 : Formation de biofilm par *S.aureus*par la technique TCP.

Les valeurs des densités optiques (DO) obtenus par le lecteur d'absorbance pour les microplaques sans saccharose sont présentées dans le tableau suivant (tableau).

Tableau10 : Résultat d'absorbance des souches par TCP

Les souches	S 01	S 02	S 03	S 04	S 05	S 06	S 07	S 08	S 09	S 10
DO temoin	0,203	0,240	0,361	0,182	0,242	0,173	0,250	0,109	0,222	0,183
DO des souches	0,471	0,244	0,304	0,189	0,127	0,134	0,504	0,123	0,124	0,374

Calcul de la DO min et la DO max :

-La valeur moyenne des puits de control (sans biofilm) DO moyenne témoin est égale à 0.216.

-la DO min des puits de control est égale à 0.405.

-la DO max des puits de control est égale à 1.215.

Les valeurs des DO des souches, DO min et DO max sont converties en histogrammes **(figure 15)**

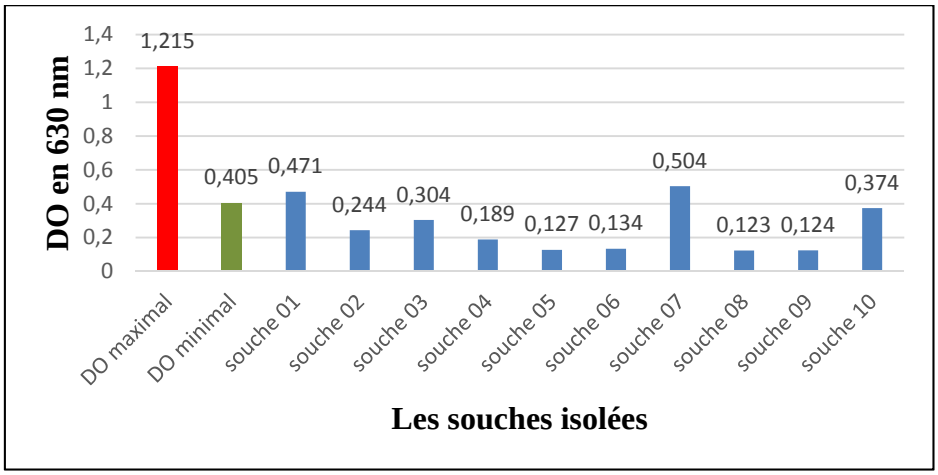


Figure15 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm par les isolats de *S.aureus* (sans saccharose)

En utilisant le milieu de croissance BHIB non additionné de supplément, seulement 02/10 (20%) des souches sont modérément productrices de biofilm avec un taux de 08/10 (80%) des souches non productrice, avec aucun souche productrice de biofilm **(Tableau 11).**

Tableau11 : Résultats de TCP sans supplément (2% saccharose)**.**

Souches	Nombre de souches testés					
	Forte		**Modérée**		**Absence**	
	N°	%	N°	%	N°	%
Staphylococcus aureus	00	00%	02	20%	08	80%
Total	10					

Les résultats obtenus par la technique TCP sont en accord avec les observations d'autres auteurs qui montrent que peu de souches sont formatrices de biofilms dans un milieu de croissance sans supplément (sucre, antibiotiques ou Nacl) **(Cho *et al*., 2002; Johannes *et al*., 2002 ; Mathur *et al*., 2006)** .

Johannes *et al.*,(2002) ont montré dans leurs étude qu'en utilisant un milieu de base, 4 souches seulement des 128 *S.aureus* isolées formaient un biofilm. De même **Mathur *et al*., (2006)** dans les mêmes conditions ont trouvé 7 souches formatrices de biofilm sur un total de 152.

III-4-2-2-Résultats de Formation de biofilm par TCP avec supplément (2% saccharose) :

Suite aux nombreuses études rapportant l'effet de la composition du milieu de croissance sur la production du biofilm, il nous a semblé utile d'étudier la formation de biofilm par la technique TCP décrite précédemment en utilisant le milieu BHIB supplémenté de 2% de saccharose.

Les valeurs des densités optiques (DO) obtenus par le lecteur d'absorbance pour microplaques avec 2% de saccharose **(tableau 12)** ont été converties en histogramme sur Excel **(Figure 16).**

Tableau12 : Résultat d'absorbance des souche par TCP.

Les souches	S 01	S 02	S 03	S 04	S 05	S 06	S 07	S 08	S 09	S 10
DO temoin	0,125	0,207	0,213	0,166	0,306	0,207	0,164	0,203	0 ,233	0,255
DO des souches	0,295	0,864	0,768	0,247	0,686	0,449	0,358	0,807	0,435	0,600

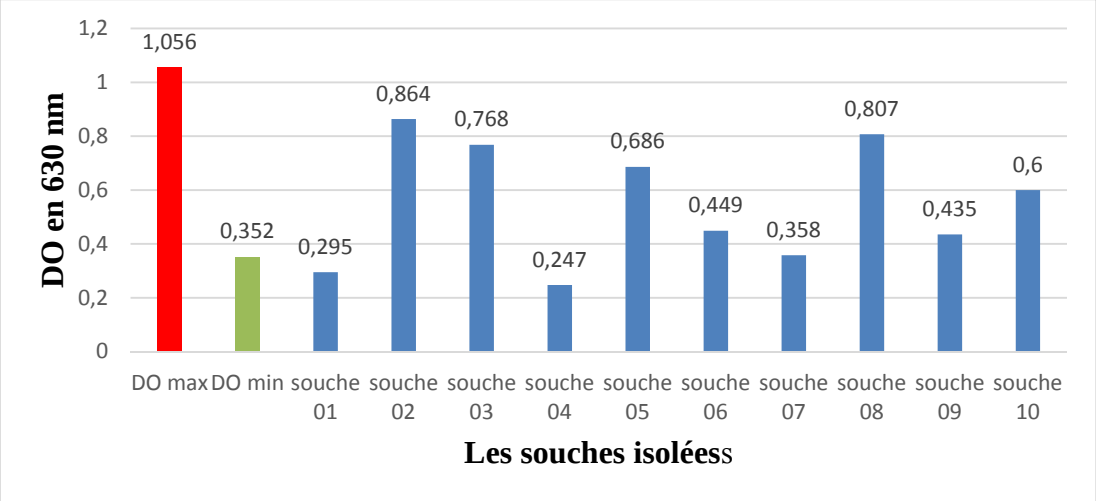


Figure16 : Résultats de la quantification de la formation de biofilm *in vitro* par les souches isolées à partir des plaies (avec 2% saccharose)

Calcul des valeurs seuils (DO min et DO max)

- La valeur moyenne des puits de contrôle (Sans biofilm) est égale à 0.208.

-DO min des puits de contrôle est égale à 0.352

-DO max des puits de contrôle est égale à 1.056

D'après l'analyse de l'histogramme et par comparaison des différentes valeurs de DO pour chacune des souches étudiées, il s'est avéré que 08 parmi les 10 souches sont modérément adhérentes présentant une DOmin<DO<DOmax , 02 souche non productrice présentant une DO<DOmin et aucune souche fortement productrice de biofilm.**(tableau 13).**

Tableau13 : Résultats de TCP avec 2% de saccharose.

Souches	Nombre de souches testés					
	Forte		**Modérée**		**Absence**	
	N°	%	N°	%	N°	%
Staphylococcus aureus	00	00%	08	80%	02	20%
Total	10					

La figure suivante **(figure 17)** décrit l'augmentation de nombre de souches de *S.aureus* formatrices de biofilm avant et après addition de saccharose

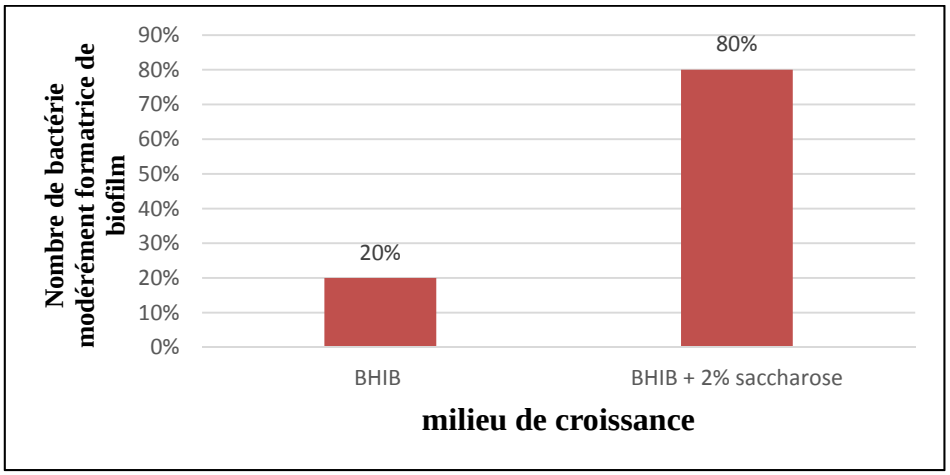


Figure17 : Formation de biofilm par S*taphylococcus aureus*par la technique TCP dans les différents milieux.

L'évaluation de la formation de biofilm en utilisant le milieu de croissance (BHIB) additionné de 2% de saccharose a révélé une augmentation du nombre de souches formatrice de biofilm par la technique TCP, le taux global de souches modérément formatrices de biofilm a augmenté de 20 % à 80% après l'ajout de saccharose **(Figure 17).** De ce fait, Le saccharose semble stimuler la formation du biofilm.

l'étude de **Rasha et ses collaborateurs (2012)** ainsi que celle **d'Agarwal, et Jain en 2013** ont montré une augmentation significative de la production de biofilm par des isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* lorsqu'ils sont exposés à des concentrations de saccharose .

D'autre part **Vuong et Otto., (2002)** expliquent que l'addition de grandes quantités de sucre au milieu de croissance des staphylocoques induit un état de stress qui à son tour stimule une fermentation, ce qui augmente la production de PIA et par conséquent la production de biofilm**.**

III-4-3- Production de biofilm par la méthode de culture en tube TM

Après lecture, on a observé qu'il y a des souches productrices, non productrices et modérément productrices de biofilm parmi les 10 souches de *S.aureus* étudiées **(photo 13)**

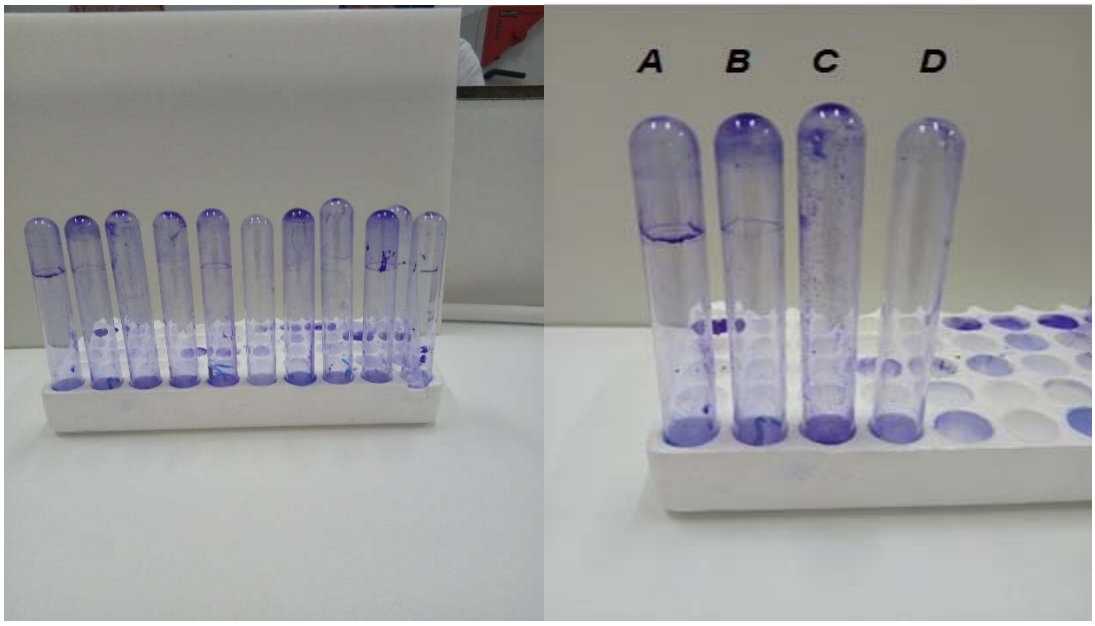


Photo personnelle 13 : Dépistage de la production de biofilm par la méthode en tube (TM) .

A :Elevé, B :Modéré ,C :Non producteur de biofilm, D :Témoin (original).

La recherche de slime par méthode TM a montré que 10%(n=01) des souches sont productrice de slime, contre 30% (n=03) de souches non productrices de slime et 60% (n=06) moyennement productrices de biofilm **(tableau 14).**

Tableau 14. Fréquence des souches formatrices de slime isolées à partir de différents types des plaies par la méthode TM

Méthode TM	Souches Isolées d'PO	Souches Isolées d'PD	Souches Isolées d'PM
Souches productrices de slime	00 (00%)	01(16,66%)	00 (00%)
Souches non productrices de slime	01 (50%)	01 (16,66%)	01(50%)
Souche moyennement productrice de slime	01 (50%)	04(66,66%)	01(50%)
Total	02(100%)	06 (100%)	01 (100%)

Tableau15 : Fréquence de souches productrices de slime par la méthode de culture en tube TM.

Les souches	Souches productrices de slime	Souches non productrice de slimes	Souches moyennement productrices de slime	Total
Pourcentage	01 (10%)	03 (30%)	06 (60%)	100%

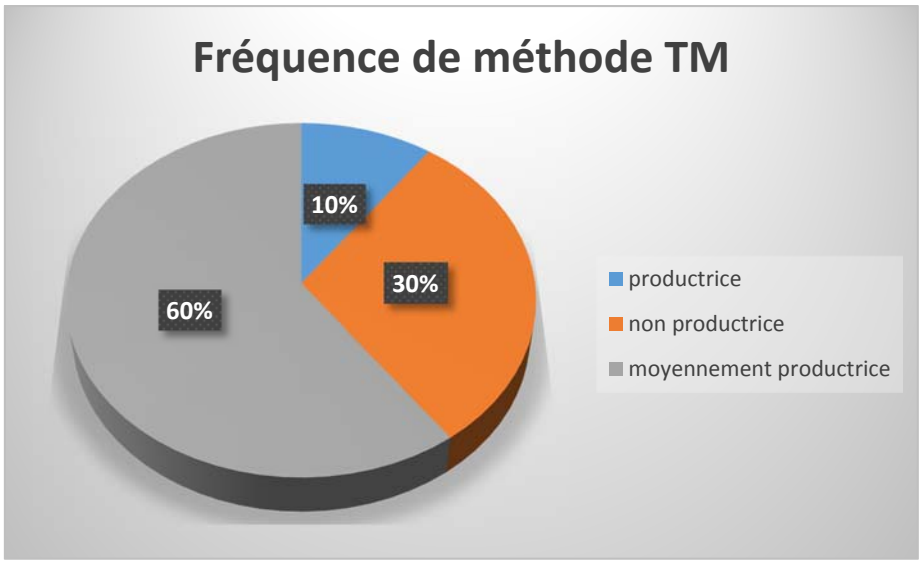


Figure18 : Fréquence de la méthode de culture en tube TM.

III-4-4- Résultats de la formation de biofilm de *S.aureus* par les deux techniques TCP et TM

Les résultats ont révélé une corrélation de la technique TM avec la technique TCP en présence de saccharose **(Tableau16).**

Tableau16 : Classification du biofilm formé par *Staphylococcus aureus* isolées des plaies par TCP et TM.

Nombre de souches isolées n=10	**Formation de biofilm**	**TCP**		**TM**
		BHIB	**BHIB2%sac**	
	Fort	00	00	01
	Modéré	02	08	06
	Absente	08	02	03

Une grande variabilité a été observée quant à la classification en biofilm positif et négatif par la méthode en tube. De même, La méthode TM semble facile à réaliser mais la lecture des résultats est peut-être difficile, car plusieurs auteurs stipulent que la formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible recouvre le mur et le bas du tube alors que d'autres considère que la formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm **(Mathur *et al*., 2006).**

Knobloch et *al*., (2001) rapportent une bonne corrélation entre les deux méthodes TCP et TM. Cependant, d'autres auteurs déclarent que la techniques TM ne pourra pas être recommandé en routine **(Mathur *et al*.,2006).**

III-4-5-Comparaison des trois techniques TM, TCP et RCA

La comparaison de la production de biofilm de nos *S.aureus*par ces trois méthodes conventionnelles est rapportée dans le tableau 17.

Tableau 17. Dépistage des 10 souches de staphylocoques isolées pour la détection de la formation de biofilm par les trois méthodes TCP, TM et RCA.

Technique	**Nombre des souches**		
	Absence	**Modéré**	**fort**
TCP	03	06	01
TM	02	08	00
RCA	02	03	05

Suite à toutes ces techniques et selon plusieurs auteurs la méthode de rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm in vitro.

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

précise et reproductible pour la détermination de la formation de biofilm à staphylocoques. Elle permet une détermination quantitative pour comparer l'adhésion des différentes souches et aussi examiner un grand nombre d'isolats simultanément **(Rasha *et al* ., 2012).** C'est une technique quantitative pratique et économique pour l'identification des facteurs et des conditions de cultures optimales pour la formation de biofilm. **(Castro Melo *et al*., 2013)**.

D'après les résultats de **Bellifa *et al.* (2014) ; Kara Terki *et al*.,(2014) ,** la technique TCP reste la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm *in vitro.* Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion dedifférentes souches **(Racha et *al* ., 2012) .**

La détection du biofilm par les méthodes TM et TCP semblent plus fiables que celle du rouge Congo **(tableau 17).**

Nos résultats concordent avec ceux d'**Oli *et al*., (2012),** où ils montrent que la technique TCP est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques.

L'étude **de Knobloch *et al*., (2002)** suggèrent que le dépistage par le rouge congo ne peut être recommandé pour évaluer la formation de biofilm pour les isolats de *S.aureus.* De même **Mathur *et al*., (2006)** ont récemment découvert que PIA (polysaccharides adhesins intracellulaires) qui influe sur la formation de biofilmpar *Staphylococcus aureus* ne peut pas être détectée par la méthode du rouge Congo.

Taj *et al*., (2012) ont montré que le dépistage par la technique de rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm et que les résultats obtenus par la technique TM sont bien corrélé avec les résultats obtenus par la microscopie électronique.

III-5- Fréquence de formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* chez les différent types des plaies

Les résultats de formation de biofilm par les trois méthodes (RCA, TCP, TM) obtenir à partir des différents types des plaies sont illustré dans le tableau suivant **(tableau 18)** :

Tableau 18 : Le nombre des souches de *S.aureus* formatrices de biofilm par les trois méthodes dans les différents types des plaies.

Les 03 techniques	**RCA**			**TM**			**TCP**		
	Fort	**Modéré**	**faible**	**Fort**	**Modéré**	**Faible**	**Fort**	**Modéré**	**faible**
Souches Isolées d'PO	00	01	01	00	01	01	00	02	00
Souches Isolées d'PD	03	02	01	01	04	01	00	05	01
Souches Isolées d'PM	02	00	00	00	01	01	00	01	01

Selon les résultats obtenus on a trouvé que la plupart des souches *S.aureus* formatrices de biofilm ont été isolées à partir des plaies diabétique avec 03 souches fortement formatrices de biofilm par la méthode RCA, 04 souches modérément formatrices de biofilm par méthode TM et 05 souches modérément formtrices de biofilm par la méthode TCP.

Les travaux réalisés par **Delorne en (2012)** et **Filloux et vallet en (2013)** ont indiqué que les biofilms formés sur les plaies diabétiques peuvent retarder la cicatrisation et l'éradication des biofilms bactériens, ce qui pose des graves problèmes sur le plan médical à cause de l'inefficacité des antibiotiques sur les biofilms et qui sont normalement efficace sur les bactéries planctoniques.

Conclusion

Conclusion

La plupart des bactéries médicales favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre dans le milieu environnemental (état planctonique).

L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser les surfaces biotiques et abiotiques. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer un biofilm. Ce dernier est responsable de nombreuses infections récalcitrantes et extrêmement difficile à l'éradiquer.

Au terme de cette étude, nous avons isolé des souches de *Staphylococcus aureus* à partir des différents types de plaies. Ces isolats ont subi des tests d'évaluation de l'aptitude de formation de biofilm par trois méthodes (TCP, RCA et TM).

L'analyse de 21 prélèvement de pus nous a permis d'isoler 10 souches de *Staphylococcus aureus*. Les résultats de l'évaluation de formation de biofilm de ces 10 souches isolées ont indiqué que cinq (5) souches sont fortement productrices de biofilm par la méthode RCA, 08 souches sont modérément formatrices de biofilm par la méthode TCP et une (01) souche est fortement productrice de biofilm par la méthode TM.

La méthode TCP est peut être recommandé comme méthode de dépistage général pour la détection des bactéries productrices de biofilm *in vitro*.
Les souches des *S.aureus* isolées des plaies diabétiques étaient des bonne formatrices de biofilm par rapport celles isolées des autres types de plaies.

La lutte contre les biofilms bactériens pose énormément de problèmes en terme de santé publique, car l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctonique se révèle bien souvent moins efficace sur les structures organisées en biofilms.

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étude des mécanismes de formation de biofilm des souches de *S.aureus* dans le but de trouver de nouveaux moyens d'élimination des biofilms et de ce fait de traitement des infections associées à ces biofilms.

Références bibliographiques

A

- **Abdallah N .M. A., Bendary Elsayed S., Mohamed M., Mostafa Y., Metwally El-gohary G.(2011).**Biofilm forming bacteria isolated from urinary tract infection, relation to catheterization and susceptibility to antibiotic.*International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research* .2(10): 172-178.
- **Afreenish H., Javaid U., Kaleem F., Omair M., Muhammad Iqba A.K. (2011)**.Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates.*Braz J Infect Dis* ; 15(4):305-311.
- **Agarwal A, Jain A**. (2013). Glucose & sodium chloride induced biofilm production &*ica* operon in clinical isolates of staphylococci. *Indian Journal of Medical Research*. 138 (2):262-266.
- **Allison DG, McBain AJ, Gilbert P (2000).** Biofilms: problems of control. In: Community Structure and Co-operation in Biofilms (Eds. Allison, D, Gilbert, P, Lappin-Scott, HM and Wilson, M), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 309–327.
- **Alnnasouri, M. (2010).**Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- **Annous, B., Fratamico, P. et Smith, J. L**. **(2009), —**Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do‖, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.
- www.pasteur.fr (maladies infféctieuses) **(2006-2007).**
- **Aouati, H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* resistances à la méthecillines: etude de leur sensibilite aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, algerie: thèse N° : 006 / SN / 2009.
- **Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME (2011).** *Staphylococcus aureus*biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. **2:** 445-459.

- **Archibald LK et Gaynes RP (1997)**. Hospital acquired infections in the United States: The importance of interhospital comparisons. *Nosocomial Inf.* **11**: 245-255.
- **Arciola CR, An YH, Campoccia D, Donati ME, Montanaro L (2005).** Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int J ArtifOrgans.* **28:**1091-100.
- **Asimus E**. *Les plaies : étude clinique, évolution histologique et traitement.* Dans *Cours de chirurgie, deuxième année du deuxième cycle*, 2001. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

B

- **Balazs DJ, Triandafillu K, Chevolot Y, Aronsson B– O, Harms H, Descouts PMathieu HJ (2003)**. Surface modification of PVC endotracheal tubes by oxygen glow discharge to reduce bacterial adhesion. *Surf Interf Anal*. **35:** 301-309.
- **Bascomb, S. et Manafi, M. (1998).** Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol.Rev.* 11, 318-340.
- **Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiellapneumoniae*isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat.Université aboubekrbelkaid, Tlemcen.
- **Beloin C., Roux A. et Svanborg C. (2008).** *Echerichia coli*, biofilms. Curr Top Microbiol Immunol *322,249-289.*
- **Bernard,** L. 2006. Mécanismes physiopathologiques des infections orthopédiques. *Rev. Rhumatol.* **73**: 327-331.
- **Bose S., Khodke M., Basak S., Mallick S.K. (2009).** Detection of Biofilm Producing Staphylococci: Need Of The HourJournal of Clinical and Diagnostic. *Research. 1915 Dec*; (3):1915-1920.
- **Branger B. (2004) ;** Hygiène des plaies et pansements - C.CLIN-Ouest 2004.p :10.
- **Branger A. (2007)**. Microbiochimie et alimentation ; 345-343.

- **Branger A**., **Richer M-M**., **Roustel S**. (2007). Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
- **Brooun A., Liu S., Lewis K. (2000).** A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*biofilms. *Antimicrobial Agents* and *Chemotherapy*. 44(3): 640-6.
- **Buyser ML et Hennekinne JA (2010).** Culture en laboratoire, méthodes d'isolement et de détection. Larpent JP, le Loir Y, Gautier M. *Staphylococcus aureus*. Editions Tec & Doc. Paris : Lavoisier, p. 65-112.

C

- **Castro Melo P., Menezes Ferreira L., Nader Filho A., Francisco Zafalon L., Isa Godoy Vicente H., et Viviane de Souza. (2013)**. Comparaison des méthodes de détection de la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* isolé de la mastite subclinique bovine. *Braz J Microbiol* ; 44 (1):119-124.
- **Chaala, W. (2013).** Occurrence et profil d'antibioresistance des S*taphylococcus aureus* isolée de produits alimentaires. université d"Es-senia Oran, Algerie.
- **Chatane I et Ziadi Ch. (2017).** Analyse phénotypique et quantitatification de la formation de biofilm par les bactéries d'intérêt médical. Thèse de Master. Université Frères Mentouri, Constantine.
- **Chalvet et Rochemonteix A. (2009).** Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.
- **Chicurel M (2000).** Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature*. **408**: 284-6.
- **Chmielewski R.A.N., Frank J.F. (2003).** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
- **Cho S., Naber K., Hacker J., Ziebuhr W**. (2002). Detection of the *ica ADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agent*. 19:570-/575.

- **Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (**1982).Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis*to smooth surfaces. *Infectiology and Immunology.* 37: 318-326.
- **Clutterbuck A.L., Woods E.J. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol*., Mar 31 ; **121** (1-2) : 1-17.
- **Collomb A.** (2011). Caractérisation de la différence de sensibilité à l'infection par *Staphylococcus aureus* de deux lignés de souris. Thèse doctorat : Médecine vétérinaire, école national vétérinaire de Toulouse .69P
- **Corbière Morot-Bizot S.** (2006). Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de doctorat : Université d'Auvergne, école doctorale des sciences de la vie et de la sante.133 P.
- **Corne P**. (2004). S*taphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de doctorat : Université de Montpellier I U.F.R. de Mececine.174P.
- **Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR (1995).** Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. **49**: 711-45.
- **Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *International journal of Antimicrobial Agents.* 11 :217-721.
- **Couderc C, jolivet S, Thiébaut ACM, Ligier C, Remy L, Alvarez AS, Lawerence C, Salomon J, Herrmann JL, Guillemot D,** Antibiotic Use and *staphylococcus aureus*Resistant to Antibiotics (ASAR) study Group. 2014. Fluoroquinolone use is a risk factor for methicillin-resistant *staphylococcus aureus*acquisition in long-term carefacilities: a nested case-case-control study. Clin Infect Dis 59:206-215. http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu236.

D

- **Daddi Oubekka S. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* Apport de la microscopie de fluorescence multimodale p46-47
- **Davido B**. (2010). Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré. Thèse de doctorat : Université Denis Diderot (Paris VII) Faculté de médecine Paris 7. 61p.

- **Djelloul Daouadji, S. (2010).** Détection de biofilm a *staphylocoque*s sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou BekrBelkaid-Tlemcen.
- **Djordjevic D., Wiedmann M., Mclandsborough L.A. (2002)**. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied And Environnemental Microbiology* ; 68(6):2950-2958.
- **Donlan RM (2001)**. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 277- 281.
- **Donlan R.M. (2002).** Biofilms :Microbiol life on surfaces. *Emerging Infections Disease journal.* 8 (9), 881-890.

E

- **Eveillard M**. **(2007).** Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat : Ecole doctorale D'Angers.159P.

F

- **Fauchere J.L, Avril J.L.** (2002).Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris. 213-217.
- **Filloux A., Vallet I. (2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, *Medecine/Sciences*, **19**, 77-83.
- **Foster, T. 1996**. *Staphylococcus*. In: S. Baron, Editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- **Freeman DJ., Falkiner FR., Keane CT. (1989)**. Nouvelle méthode pour détecter la production de boues par des staphylocoques à coagulase négative. *J Clin Pathol* ; 42:872-874
- **Fromantin I. (2012).** Etude de la flore bactérienne dans les plaies tumorales du sein : incidence des biofilms bactériens sur l'évolution des plaies et le

développement d'odeurs. Thèse de doctorat en médecine et santé. Université de Cergy-Pontoise.

- **Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology.* **13**: 34-40.
- **Fux CA, Wilson S, Stoodley P (2004).** Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphyloccocusaureus*biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. *J Bacteriol.* **186** (14):4486-91.

G

- **Garnier F, Denis F. (2007).**Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. Chapitre 29 .251, 254.
- **Gilbert P et Brown MR (1998).** Biofilms and beta-lactam activity. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* **41**: 571-572.
- **Givskov M., Kjelleberg S. (2007)**. The biofilm mode of life : Mechanisms andadaptation ; 300.
- **Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ (2000).** Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res.* **50:** 208-214.
- **Gregory C.R**. Wound healing and influencing factors. DansManual of canine and feline wound management and reconstruction, British Small Animal Veterinary Association. 1999 : p. 13-23.

H

- **Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2(2): 95-108.
- **Harold C., Slavkin D.D. (1997)**. Biofilms, Microbial ecology and Antoni Van Leeuwenhoek. *National institute of dental research* ; 128(4) :492-495.
- **Harris, L. G, S. J. Foster et R. G. Richards**. (**2002)**. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S.*

*aureus*adhesins in relation toadhesion to biomaterials: review. *Eur. Cells Mater*. 4: 39-60.

- **Harris, L. G. et R. G. Richards**. **(2006)**. Staphylococci and implants surfaces: a review. *Injury, Int. J. Care Injured* **37**: S3-S14
- **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*,Vol. 3 No. 2, pp. 55-65.
- **Hou W., Sun X., Wang Z. et *al*., (2012),** Investigative Ophthalmology& Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9.5624.5631.
- **Houari A. (2009).** Caractérisation de biofilms formés à la surface de membranes de nanofiltration dans un processus de production d'eau potable et stratégies de lutte anti-biofilms. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Cergy- Pontoise, France.
- http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/
- **Hygis N. (2010)**. hygiénehospitaliére ; 513.

J

- **Jass J, Surman S and Walker JT (2003)**. Microbial Biofilms in Medicine. In: *Medical Biofilms: Detection, Prevention and Control.*England*:* John Wiley & Sons Ltd, p 1-23.
- **Johannes K.M., Knobloch M.A., Horstkotte H., Dietrich M. (2002).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 191: 101–106.
- **Johnston D.E. (1992).** *Traitement des traumatismes tissulaires.* Point vétérinaire,. 24(numéro spécial "chirurgie plastique et reconstructrice") : p. 451-463.

K

- **Kaplan J. B., (2010),** Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and

Potential Therapeutic Uses, *Journal of Dental Research*, **89** (3): 205-215.

- **Kara Terki I. (2014)**. Caracterisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Telemcen.Thése de doctorat .Université Abou Bakr Belkaid, Telemcen.
- **Kenneth A.W**. et **Michael S.R.,** The structure and function of the skin, in Dermatological and transdermal formulations, Kenneth A.W., Editor. 2002, Marcel Dekker: New York. p. 1-40.
- **Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K (2004).** Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS MicrobiolLett.* **230**: 13-18.
- **Knobloch J.K ., Bartscht K ., Sabottke A ., Rohde H ., Feucht H.H ., Mack D.** (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology*. 183, 2624-2633.
- **Kurlenda, J. et M. Grinholc.** (2012). Alternative therapies in *Staphylococcus aureus*diseases. *ActaBiochim. Pol.* **59**:171-184**.**

L

- **Lavigne J P., Sotto A. (2007).** Recommandations pour la bonne pratique du prélèvement microbiologique dans les infections cutanées et osseuses : à propos du pied diabétique. Spectre biologie ; 159 :29-34.
- **Lebeaux D., Ghigo J M. (2012).** Infections associées aux biofilms quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale . Medecine /Science ; 28 :727-739.
- **Leclercq R.** (2002).Résistance des Staphylocoques aux antibiotiques. *Annale Français d'anesthésie et réanimation*. 21**:** 375-383.
- **Lewis K et Ausubel FM (2006).** Prospects for plant derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* **24**:1504-1507.
- **Liesse Iyamba J-M. (2012).**Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.

- **Lowy F.D (1998)**. Staphylococcus aureus infections The new england journal of medicine 1998, 339: 520–32 .

M

- **Mah T. F, O'Toole G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiology.* 9(1): 34-9.
- **Marchal M. (2010).** Etude des biofilms bacterirns arsénite-oxydants. *thése de doctorat.Université de strasgbord,France.*
- **Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006)**. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci : an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* ; 24:25-29.
- **Merlet A**. (2010). Implication de la leucocidine de Panton et Valentine dans les infections sévères à *Staphylococcus aureus* en Nouvelle-Calédonie thése de doctorat : Université Bordeaux 2 des sciences médicales.117P**.**
- **Muller A.** et **Guaguere E. (2014).**L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. Conflits AFVAC. Médecine interne / maladies infectieuses. Paris - la Défens.

N

- **Nagant C. (2013).** Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de P. aeruginosa. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- **Nagaveni S., Rajeshwari H., Ajay Kumar Oli., Patil S.A., et Kelmani Chandrakanth R. (2010).** Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa.* The Bioscan; 5(4) : 563-566.
- **Nasr SA., AbuShady H M., Hussein HS. (2012).** Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 1110-8630.
- **Noble WC**, **Willie JA**. Carriage of inhibitor-producingorganisms on human skin. J Med Microbiol 1980;13(2):329-332.

O

- **OLBRDAD Touria** ; 23 May 2014 ; THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE ; LE DERME ARTIFICIEL DANS LA RECONSTRUCTION CUTANEE. MATRIDERM® ET INTEGRA® ; U.F.R DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN. P :20-23-24.
- **Oli A.K., Raju S., Nagaveni S., Kelmani Chandrakanth R. (2012)**. Biofilm formation by Multidrug resistant Enterococcus faecalis (MDEF) originated from clinical samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*.
- **Oliveira DR (1992).** Physico-chemical aspects of adhesion. Dans Biofilms-Science and technology. Melo L.F., Bott T.R., Fletcher M., Capdeville B. Ed., NATO ASI Series, Serie E: applied sciences, Vol 223, ISBN: 0-7923-2022-0, p. 45-58.
- **O'Toole G. A., Kaplan HB., Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology.* 54: 49- 79
- **Otto M (2008).** Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* ***322***: 207–228.
- **Otto, M.** 2012**.** MRSA virulence and spread. *Cell. Microbiol.* **14:** 1513-1521**.**
- **Ouchar mahamat O., Tidjani A., Savadogo A., Abakabir mahamat A., Somda MK., Traore A.S. (2013)**. Isolement et caractérisation des bactéries productrices des biofilms issues des produits alimentaires. *Microbiol. Ind. San et Environn* ; 7(2) :187-210.

P

- **Pecastaings S. (2010).** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*et *Legionellapneumophila*à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- **Peeters.E., Nelis, H. J. et Coenye, T. (2008**).Compaaison of multiple méthods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods **72,157-165.**

- **Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW (2012).** Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. Int Wound J; 9(1):14-32.
- **Perrin, C. (2009).** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I- Claude Bernard, France.
- **Phillips P L., Wolcott R D., Fletcher J., Schultz G S. (2011).** Biofilms made easy.Wounds international.1: 1-6.
- **PMathieu HJ (2003)**. Surface modification of PVC endotracheal tubes by oxygen glow discharge to reduce bacterial adhesion. *Surf Interf Anal*. **35:** 301-309.
- **Pouillot, A.,** *et al*., The *stratum corneum*: a double paradox. J. Cosmet. Dermatol., 2008. 7(2): p. 143-8.
- **Prescott L.M, Harley J.P, Klein D (2010).** Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université.

Q

- **Quincampoix J.C, Mainardi J.L. (2001).** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif.*Réanimation*. 10**:** 267-275.

R

- **Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S.** (2012).Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic* .13: 269–274.
- **Remy D**. et **Witz M**. *Conduite à tenir devant une plaie.* Point vétérinaire, 1992. 24 (numéro spécial "chirurgie plastique et reconstructrice") : p. 573-581.
- **Remy D. (1994).** *Classification et traitement des plaies*. Dans *Encyclopédie vétérinaire, Chirurgie des tissus mou*: p. 800-806.
- **Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013).** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. IOSR Journal of

Pharmacy and BiologicalSciences. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.

- **Roux A., Chigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens, *Bull. AcadVét*, 261-268.

S

- **Sauer K., Camper A.K., Eherlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. 184, 1140-1154
- **Schaechter M, Medoff G, Eisenstein Barry I (1999).** Microbiologie et pathologie infectieuse. De BoeckUniversité, Paris Bruxelles ; p188-189.
- **Schaefer H**. and **T.E.** Redelmeier, Skin Barrier: principles of percutaneous absoprtion, 1996, Karger, Basel.
- **Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA (1998)**. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *J Col Interf Sci*. **208:** 23-33.
- **Singh R, Ray P, Das A, Sharma M (2009).** Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *Journal of medical microbiology.* **58**: 1067-1073.
- **Singh P K., Parsek M R., Greenberg E P., Welsh M J. (2002).** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature., 417: 552-555.
- **Stanley N. R., Britton A. R., Grossman A. D., Lazazzera B. A. (2003),** Identification of catabolites repression as a physiologicalregulatorok biofilm formation by *Bacillus subtilis*by use of DNA microarrays, *Journal of Bacteriology*,**185** (6): 1951- 1957.
- **Stewart P. S, J. W. Costerton. (2001)**. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358(9276): 135-8.
- **Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies et J. W. Costerton**, (2002) Biofilms as complexdifferentiatedcommunities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187-209.
- **Sutherland IW (2001).** The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9**: 222-227.

T

- **Taj, Y., Farhan E., Essa, F., Aziz F., Shahana Kazmi U. (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Infect Dev. Ctries; 5(6):403-409.
- **Talaro, Kathleen, Park (2008**), *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York.
- **Tchougoune M. L. (2007)** . Prévalence des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline au CHU du Point G. Thèse de doctorat : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontolstomatologie. 89p.
- **Tolker- Nielsen T., Molin S. (2000).** Spetial organization of microbial biofilm communities. Microb Ecol., 40: 75-84.
- **Touati A., Achour W., Abbassi et al.,** (**2007**), Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de Staphylococcus epidermidis isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, *Pathologie Biologie*, **55** : 277–282
- **Tran, M.A., R.J. Watts**, and **G.P**. Robertson, Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. Pigment Cell & Melanoma Res., 2009. 22(4): p. 388-399.

U

- **Utili R, Durante-Mangoni E, Tripodi MF (2007).** Infection of intravascular prostheses: how to treat other than surgery. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **30** S: S42- S50.

V

- **Vieu G. (2014)**. Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-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 iii – Paul Sabatier. Faculté des sciences pharmaceutiques.

- **Vincenot, F., M. Saleh et G. Prévost.** 2008**.** Les facteurs de virulence de *Staphylococcusaureus*. *Rev. Fr. Labo.* **407**: 61-69.
- **Virginie L (2008).** Influence du cuire sur les biomasses microbiennes dans les canalisations d'eau. Th. doct., Faculté de de pharmacie de ChatenayMalabry. Paris, France.
- **Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. et Ivanova, E. P. (2009), —**Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation‖, *Molecules*, Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.
- **Vuong C, Otto M. (2002).** Staphylococcus epidermidis infections. *Microbiology and Infectiology*. 4:481-489.

W

- **White R**. *The aetiology and classification of wound and skin feficits*.

Dans*Manual of canine and feline wound management and reconstruction*, British Small Animal Veterinary Association. 1999 : p. 5-12.

Z

- **Zahlane, K. H.** (2007). Staphylocoque: état actuel de l'épidémiologie et de l'antibiorésistance au CHU de Rabat. *Maroc Médical, tome 29 n°4* , 279-285.
- **Zhao G., Usui M L., Lippman S I., James G A., Stewart P S., Fleckman P., Olerud J E. (2013)**. Biofilms and inflammation in chronic wounds. Advances in wound care; 2:389-399.
- **Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2010)**. A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New microbiologica* ; 33:137-145.

Annexes

Annexes

Annexe 01: composition des milieux et des réactifs utilisés

1. Milieu de Chapman :

Composition:

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

Extrait de viande (bovin ou porcin) ……..1g

Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin) ……10g

Chlorure de sodium ……..……75g

Mannitol ……..10g

Agar ……..……...……15g

Rouge de phénol ……..……...……0,025g

pH=7,6

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

Milieu de Rouge congo agar (RCA)

-Composition: en g/l (Nasr et al,2012)

Coeur cervelle…… 37g

Saccharose ……..50g

Agar ……10g

Rouge Congo ……0.8g

Eau distillée…….. 1000ml

pH ; 7,4

Milieu de gélose Columbia

Peptone trypsique de caséine ……7,5g

Peptone pepsique de viande……7,5g

Amidon de mais ……..1,0g

Hydrogénophosphate de potassium…….4,0g

Dihydrogénophosphate de potassium…….1,0g

Chlorure de sodium …….5,0g

Hémoglobine……10g

Suppliment glucosé, vitamine type Polyvitex……1,0ml

Agar……15,0g

PH= 7,2

Préparation :

Bouillon coeur-cervelle (BHIB) :

Composition :

Infusion de cervelle de veau ……..….12.5g

Infusion de coeur de bœuf ……..……..5.0g

Peptone ……...…...10.0g

Glucose…….....2.0g

Chlorure de sodium ……....2.0g

Phosphatase di sodique …….…….5g

pH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

Réactifs de la coloration de Gram

-Violet de gentiane:

Phénol……..…… 2.0 g

Violet de gentiane……...…… 1.0 g

Éthanol à 90°…….…… 10 ml

Eau distillée……..... 100 ml

-Lugol:

Iodure de potassium…… 2.0 g

Iode métalloïde…….……...……. 1.0 g

Eau distillée ……..… 300 ml

-Alcool (éthanol)

-Fuschine de ziehl:

Fuchine basique…….….. 1.0g

Phénol…….. 5.0 g

Éthanol à 90°……..……10 ml

Eau distillée …….....……..100 ml

Composition de Sérum physiologique :

Chlorure de sodium ……9g

Eau distillée qsp…… 1000 ml

Composition du tampon phosphate salin (BPS) (Hamilton, 2003)

NaCl ……8.0g

KCl ……..0.2g

Na2HPO4……..1.44g

KH2PO4…… 0.2g

Eau distillée……....1000 ml

pH ; 7,4

Annexe 02 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph

tests	substrats	Caractère recherché	Résultat	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrite	Nit 1 + Nit 2 / 10 min	
			Incolore /Rose	Rouge
PAL	β-naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min	
			Jaune	Violet

VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VIP 1 + VIP 2/ 10 min	
			Incolore / rose	Violet / Rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir de carbohydrate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α-méthyl-d-glucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /Rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge /Violet

Annexe 03: Tableau des Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus*

ATB testés	**Charge des disques**	**Diamètres critiques (mm)**		
		R	**I**	**S**
Pénicilline (*S.aureus* et *S.lugdunensis*)	10	≤ 28	….	S
Oxacilline (*S.aureus* et *S.lugdunensis*)	…..	…..	…….	……..
Cefoxitine *(S aureus*)	30	≤ 21	……	≥ 22
Oxacilline (S.C.N.sauf *S.lugdunensis*)	……	……	…….	…..
Cefoxitine(S.C.N.sauf *S.lugdunensis*)	30	≤ 24	…..	≥ 25

Gentamicine	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamycine	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Amikacine	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Erytromycine Clindamycine	15 2	≤ 13 ≤ 14	14-22 15-20	≥ 23 ≥ 21
Vancomycine (S.aureus)		….	….	….
Vancomycine (S.C.N)		….	….	….
Teicoplanine	30	≤ 10	11-13	≥ 14
Ofloxacine	5	≤ 14	15-17	≥ 18
Ciorofloxacine	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Lévofloxacine	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Trimethoprime+ Sulfamitoxazole	1.25/23.75	≤ 10	11-15	≥ 16
Rifampicine	5	≤ 16	17-19	≥ 20
Tétracycline	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Cloromphénicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Acide fusidique **	10	≤ 24	…….	≥ 24
Fosfomycine IV**		…….	……..	……

***Tableau extrait du document M100 – S21. Vol. 31, n°1. **2011**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement.

****Extraits des recommandations **2011** du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Annexe 04 : Matériel utilisé



Vortex



spectrophotomètre



Autoclave



Lecteur de microplaque



Etuve



Microscope

Annexes



Agitateur magnéitique



Ballance de précision