

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou



Faculté des Sciences Biologique et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire :

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

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Sujet

Antibiorésistance et capacité de formation de biofilm *in vitro* de souches de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et animale

Présenté par :

- BOUZIANE Nawal
- HACHOUR Nadia

Le jury :

- Présidente : Melle MEGUENNI Nassima., MCA à l'UMMTO
- Encadreur : Mr TITOUCHE Yacine., MCA à l'UMMTO
- Examinatrice : Melle ASMANI Katia., MCA à l'UMMTO

Remerciements

Nous remercions avant tous, Dieu le tout puissant pour la santé, la volonté et la patience qu'il nous a donné durant nos années d'études ainsi que pour la réalisation de ce modeste travail.

Tout d'abord, Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements et nos profondes gratitude à notre promoteur monsieur TITOUCHE YACINE, maitre de conférences à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi Ouzou, pour son encadrement fructueux, sa générosité, sa disponibilité, son suivi au cours de notre travail. Nous avons pu bénéficier de ses précieuses informations, ses compétences scientifiques, ses conseils, sa rigueur dans le travail ainsi que les moyennes qu'il a mis à notre disposition.

Nous tenons également à exprimer nos remerciements les plus sincères à M^{elle} MEGUENNI Nassima maitre de conférences à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi Ouzou, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Nos vifs remerciements s'adressent à M^{elle} ASMANY Katia, maitre de conférences à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté de juger ce travail et faire partie de ce jury en qualité d'examinatrice.

Nos profonds remerciements vont également à tous les enseignants qui nous ont donné les bases de la recherche pendant tout notre parcours et les personnes qui nous ont aidé et contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

On remercie également les deux binômes Dehvia, Nada, Cylia et Lydia avec lesquelles nous avons partagé la période de la partie pratique au niveau du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologique.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents Mohammed et Fadila pour leur aide et leur soutien tout au long de mes études.

A mes chères frères et sœur Salim, Abdelhafid et Maroua

A tous mes cousins et cousines

A mes amies spécialement Nadia et Rekia

A toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.

Nawal

Dédicaces

Avec un énorme plaisir et un cœur ouvert que je dédie ce travail

Spécialement à mes très chers parents Tassadite et Mohamed Amokrane ainsi qu'à mes grands-parents.

A mes chères frères et sœurs.

A tous mes cousins et cousines.

A mes amies spécialement Nawal, Manel, Dyhia, Tinhinane sans oublier mes copines de résidence universitaire Mariam, Tiziri et mon meilleur ami Mohamed.

A toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.

Nadia

Résumé

Staphylococcus aureus est une bactérie opportuniste causant une grande variété de maladies aussi bien chez l'homme que chez l'animal. L'objectif principal de la présente étude est de caractériser les souches de *S. aureus* d'origine animale et alimentaire, en ce qui concerne leur antibiorésistance, puis, de détecter, *in vitro*, leur capacité à former des biofilms par deux méthodes : la méthode de plaque de culture de tissus et la méthode de culture sur la gélose au rouge Congo (RCA).

Au total, 179 souches de *Staphylococcus aureus* ont été testées, dont 97 souches d'origine animale, tandis que 80 souches proviennent de divers produits alimentaires. Une forte résistance vis-à-vis de la pénicilline G (73,32%); ainsi, des résistances relativement faibles allant de 4% à 25% ont été observées vis-à-vis du reste des molécules d'antibiotiques. Dix-neuf souches (10,73%) sont résistantes à la méticilline (SARM) et 38 (21.43%) souches sont multirésistantes. Les études d'adhésion bactérienne et de formation du biofilm ont révélé que 80% des souches produisaient un slime bactérien par la technique du rouge congo, ainsi que toutes les souches de *Staphylococcus aureus* quel que soit leur origine ont montré une capacité à-former des biofilms.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent bien le risque sanitaire associé à la présence des SARM et de souches formatrices de biofilms dans les denrées alimentaires et chez les animaux. Ainsi, l'application des règles de biosécurité et les bonnes pratiques d'hygiène tout le long de la chaîne de production sont nécessaires.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, biofilm, résistance aux antibiotiques, slime bactérien, SARM.

Abstract

Staphylococcus aureus is an opportunistic bacterium causing a wide variety of diseases in both humans and animals. The main objective of the present study is to characterize *S. aureus* strains of animal and food origin, with regard to their antibiotic resistance, and their capacity to form biofilm in vitro, using two methods, including: the tissue culture plate method and the Congo red agar (RCA) culture method.

A total of 179 strains of *Staphylococcus aureus* were tested, including 97 and 80 strains isolated from animal and food origin, respectively. A high resistance to penicillin G (73.32%). However, low resistances, ranging from 4% to 25%, were observed against the remaining molecules. Nineteen strains (10.73%) were resistant to methicillin (MRSA) and 38 (21.43%) strains were multi-drug resistant. Bacterial adhesion and biofilm formation studies revealed that 80% of strains produced bacterial slime in congo red agar, while, all tested strains were able to form biofilm in microtiter plate.

The results obtained in this study show clearly the health hazards associated with the presence of MRSA and biofilm-forming strains in foodstuffs and in animals. Thus, the application of biosecurity rules and good hygiene practices throughout the production chain are necessary.

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilm, antibiotic resistance, bacterial slime, MRSA.

المخلص

المكورات العنقودية الذهبية هي بكتيريا انتهازية تسبب مجموعة متنوعة من الأمراض في كل من البشر والحيوانات . الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تمييز سلالات المكورات العنقودية الذهبية من أصل حيواني وغذائي، فيما يتعلق بمقاومتها للمضادات الحيوية، ثم الكشف في المختبر عن قدرتها على تكوين غشاء حيوي بطريقتين: طريقة لوحة زراعة الأنسجة وطريقة الاستزراع على أجار الكونغو الأحمر .

تم اختبار 179 سلالة من المكورات العنقودية الذهبية، منها 97 سلالة من أصل حيواني. بينما 80 سلالة تأتي من مختلف المنتجات الغذائية. تمكنا من إثبات مقاومة عالية للبنسلين جي (73.32%) ، كما لوحظ وجود مقاومة منخفضة نسبياً تتراوح من 4% إلى 25% ضد باقي جزيئات المضادات الحيوية. تسعة عشر سلالة (10.73%) مقاومة للميثيسيلين و 38 سلالة (21.43%) متعددة المقاومة. أظهرت دراسات الالتصاق البكتيري وتكوين الأغشية الحيوية أن 80% من السلالات أنتجت الوحل البكتيري بتقنية كونغو الأحمر، وكذلك جميع سلالات المكورات العنقودية الذهبية بغض النظر عن أصلها أظهرت قدرة على تكوين الأغشية الحيوية.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة بوضوح المخاطر الصحية المرتبطة بوجود العنقوديات الذهبية المقاومة للميثيسيلين والسلالات المكونة للغشاء الحيوي في المواد الغذائية والحيوانات. وبالتالي ، فإن تطبيق قواعد الأمن البيولوجي وممارسات النظافة الجيدة في جميع أنحاء سلسلة الإنتاج أمر ضروري.

الكلمات المفتاحية : المكورات العنقودية الذهبية ، الأغشية الحيوية، مقاومة المضادات الحيوية، الوحل البكتيري، العنقوديات الذهبية المقاومة للميثيسيلين.

Table de matière

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux	III
Liste des figures	IV
Introduction	1

Synthèse des données bibliographiques

Chapitre I : Généralités sur *Staphylococcus aureus*

I-1- Historique	3
I-2- Taxonomie	3
I-3- Habitat	4
I-3-1- Chez l'être vivant	4
I-3-2- Dans l'environnement	5
I-3-3- Dans les aliments et leur environnement de production	6
I-4- Mode de transmission	6
I-5- Caractères bactériologiques	6
I-5-1- Caractères morphologiques	6
I-5-2- Caractères cultureux	7
I-5-3- Caractères physiologiques et biochimiques	9
I-6- Facteurs de virulence et pathogénicité	9
I-6-1- Constituants de l'enveloppe	9
I-6-1-1- Exopolysaccharides capsulaires	9
I-6-1-2- Composants de la paroi	10
I-6-1-2-1- Peptidoglycane ou mucopeptide	10
I-6-1-2-2- Acides teichoïques et acides lipoteichoïques	11
I-6-2- Protéines de surfaces	12
I-6-2-1- Protéine A	12
I-6-2-2- Facteurs d'invasion et d'adhésion	13
I-6-2-3- Adhésines ancrées dans la paroi (MSCRAMM)	13
I-6-2-4- Protéine de liaison au collagène (Cna)	13
I-6-2-5- Protéine de liaison au fibrinogène (ClfA et ClfB)	13
I-6-2-6- Protéine de liaison au fibronectine (FnBA et FnBB)	13
I-6-2-7- Adhésines sécrétées (SERAM)	14
I-6-2-8- Protéine Eap	14
I-6-2-9- Protéine Efb	14

I-6-3- Substances élaborées par <i>S. aureus</i>	14
I-6-3-1- Les enzymes	14
I-6-3-1-1- Catalase	14
I-6-3-1-2- Coagulase	15
I-6-3-1-3- Désoxyribonucléase thermostable	15
I-6-3-1-4- Bêta-lactamase	15
I-6-3-1-5- Hyaluronidase	15
I-6-3-1-6- Fibrinolysine	15
I-6-3-1-7- Protéases	15
I-6-3-1-8- Lysosyme	15
I-6-3-1-9- Lipases et estérases	15
I-6-3-2- Les toxines	15

Chapitre II : Antibiorésistance

II-1- Historique	17
II-2- Définition des antibiotiques	18
II-3- Critères de classification des antibiotiques	18
II-3-1- Origine	18
II-3-2- Spectre d'activité	18
II-3-3- Effet d'un antibiotique	19
II-3-4- Leur structure chimique	19
II-3-5- Mode d'action des antibiotiques	19
II-4- Résistance aux antibiotiques	20
II-4-1- Définition de la résistance bactérienne	20
II-4-2- Support génétique de la résistance bactérienne	20
II-4-2-1- Résistance naturelle	20
II-4-2-2- Résistance acquise	21
II-4-3- Principaux modes de résistances des bactéries	21
II-4-3-1- Inactivation enzymatique de l'antibiotique	21
II-4-3-2- Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique	22
II-4-3-3- Réduction de la perméabilité cellulaire	22
II-4-3-4- Phénomène d'efflux	22
II-4-3-5- Protection de la cible de l'antibiotique	22
II-4-3-6- Piégeage de l'antibiotique	22

II-4-4- Mécanismes de résistance chez <i>S. aureus</i>	23
II-4-4-1-Résistance aux β -lactamines	23
II-4-4-1-1-Production de β -lactamases	23
II-4-4-1-2-Modification de cible	24
II-4-4-2-Résistance aux glycopeptides	24
II-4-4-3-Résistance aux Tétracyclines	25
II-4-4-4- Résistance aux Quinolones	25
II-4-4-5-Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS)	26
II-4-4-6-Résistance aux aminosides	27
II-4-4-7-Résistance aux Phénicolés	27

Chapitre III : Formation de biofilm

III-1- Historique	28
III-2- Définition	28
III-3- Composition du biofilm	29
III-3-1- Les microorganismes	29
III-3-2- La matrice	29
III-4- Formation de biofilms chez <i>S. aureus</i>	30
III-4-1- conditionnement de la surface	30
III-4-2- Transport des bactéries vers le support	30
III-4-3- l'Adhésion	31
III-4-4- Croissance et maturation du biofilm	32
III-4-5- Dispersion/ détachement du biofilm	33
III-5- Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	34
III-5-1- Caractéristiques de la surface	35
III-5-2- Caractéristiques du milieu	35
III-5-3- Caractéristiques des microorganismes	35
III-6- Avantages et conséquences du mode de vie biofilm	35
III-6-1- Coopérations métaboliques et échanges d'informations au sein du biofilm	35
III-6-1-1- Coopération métabolique	35
III-6-1-2- Signalisation au sein du biofilm	36
III-6-2- Transfert d'information génétique au sein du biofilm	36
III-6-3- Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement	36
III-7- Effets bénéfiques et néfastes de biofilms	37
III-7-1- Effets bénéfiques	37

III-7-2- Effets néfastes des biofilms	38
III-8- Biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> dans l'industrie alimentaire	38
III-9- Biofilms dans le secteur médical	39
III-10- Dépistage de la production de biofilms	39
III-10-1- Dosage phénotypique	39
III-10-1-1- Observation indirecte	39
III-10-1-1-1- La microplaques de titration	39
III-10-1-1-2- Méthode du tube	40
III-10-1-1-3- La culture sur Rouge Congo Agar (RCA)	40
III-10-1-1-4- Le Biofilm Ring Test (BRT)	41
III-10-1-2- Observation directe	42
III-10-1-2-1- La microscopie optique	42
III-10-1-2-2- Le microscope électronique à balayage (MEB)	42
III-10-1-2-3- La microscopie confocale à balayage laser (CLSM)	43
III-10-2- Dosage génotypique	44
III-10-2-1- Détection des gènes associés au biofilm par PCR	44
III-10-2-2- Hybridation in situ fluorescente (FISH)	45

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1- Objectif de l'étude	46
2- Matériels	46
3- Matériels biologiques	46
4- Milieux de culture et réactifs	46
4-1- Milieux de culture	46
4-1-1- Milieux de culture liquides	46
4-1-2- Milieux de culture solides	47
4-2- Réactifs	47
5- Méthodes	47
5-1- Lieu et durée de l'étude	47
5-2- Origine des souches testées	47
5-3- Revivification des souches de <i>S. aureus</i>	47
5-4- Purification des souches	47
5-5- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	48
5-6- Evaluation de la formation de biofilms <i>in vitro</i>	50

5-6-1- La culture sur Rouge Congo Agar (RCA)	50
5-6-2- Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)	50

Résultats et discussion

I- Résultats	52
1-1- Nombre de souches testées	52
1-2- Antibiorésistance des souches isolées	53
1-3- Nombre et phénotypes des souches multirésistantes	54
1-4- Prévalence de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	55
1-5- Détection de la formation de biofilm chez les souches de <i>S. aureus</i> isolées	56
1-5-1- Méthode de culture sur la gélose au rouge de congo (RCA)	56
1-5-2- Technique de plaque de Culture de Tissu (TCP)	58
II- Discussion	63
Conclusion et perspective	68
Références bibliographiques	70
Annexes	

Liste des abréviations

AAC	Aminoglycoside acétyltransférase
AAD	Aminoglycoside nucléotidyltransférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AI	Auto-inducteurs
APH	Aminoglycoside phosphotransférase
ARN	Acide ribonucléique
BAP	Biofilm associated protein
BHA	Brain heart agar
BHI	Brain Heart infusion
BRT	Biofilm ring test
Can	Collagen binding protein
CASFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CBA	Columbia blood agar
Cif	Clumping factor
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM	La microscopie confocale à balayage laser
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Eap	Extracellular fibrinogen binding protein
Efb	Extracellular fibrinogen binding protein
Emp	Extracellular matrix binding protein
EPS	Exopolysaccharides
FISH	Hybridation <i>in situ</i> fluorescente
Fnb	Fibronectin binding protein
Ig	Immunoglobuline
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEBE	Microscopie électronique à balayage environnemental
MH	Mueller Hinton
MLSb	Macrolides, Lincosamides, streptogramineb
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NAG	N-acétylglucosamine

NAM	Acide N-acétylmuramique
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase chain reaction
PDG	Peptidoglycane
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin
PLP	Panton valentin leucocidin
PSM	Phenol-soluble modulins
PVL	Leucocidine de Panton-Valentine
RCA	Rouge congo agar
SARM	<i>S. aureus</i> résistant à la méticilline
SCN	Staphylocoques à coagulase négative
SCP	Staphylocoques à coagulase positive
SERAM	Secretable expanded repertoire adhesive molecules
TCP	Plaque de culture de tissus
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Bouillon tryptone soja
TSST	Toxin shock syndrom toxin
UV	Ultraviolet
VISA	<i>S. aureus</i> résistante à la vancomycine

Liste des tableaux

Tableau I : Différentes toxines secrétées par <i>S. aureus</i> et leur mode d'action	15
Tableau II : Listes des molécules d'antibiotiques testées	48
Tableau III : Classification de l'adhésion des <i>Staphylocoque spp</i> (ACHEK <i>et al.</i> , 2020).....	51
Tableau IV : Nombre de souches d'origine alimentaire et animale	52
Tableau V : Fréquence de résistance des souches <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	53
Tableau VI : Nombre des souches <i>S. aureus</i> d'origine alimentaire résistantes aux antibiotiques	54
Tableau VII : Nombre des souches <i>S. aureus</i> d'origine animale résistantes aux antibiotiques	54
Tableau VIII : Phénotypes de multirésistance des souches <i>S. aureus</i>	54
Tableau IX : Phénotypes de résistance des souches SARM	56
Tableau X : Répartition des souches <i>S. aureus</i> d'origine alimentaire en fonction de la production de slime bactérien	57
Tableau XI : Répartition des souches <i>S. aureus</i> d'origine animale en fonction de la production de slime bactérien	57
Tableau XII : Distribution des souches <i>S. aureus</i> formatrices de biofilm	59
Tableau XIII : Lien entre la capacité de formation de biofilm à l'aide du test TCP et la résistance aux antibiotiques	61
Tableau XIV : Lien entre la capacité de formation de biofilm à l'aide du test TCP et la distribution des gènes codant des entérotoxines	61

Liste des figures

Figure 01 : Prévalence de <i>S. aureus</i> dans les différentes parties du corps humain (VERBRUGH, 2009)	5
Figure 02 : Visualisation de <i>S. aureus</i> en microscopie à balayage à différents grossissements (MERGHNI <i>et al.</i> , 2017)	7
Figure 03 : Staphylocoques en amas (SPICER, 2003)	7
Figure 04 : Culture de <i>S. aureus</i> sur milieu TSA (KAISER, 2017)	8
Figure 05 : Croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose au sang (CHEN <i>et al.</i> , 2014)	8
Figure 06 : Colonies caractéristiques de <i>S. aureus</i> sur milieu de Baird Parker (DE BUYSER et SUTRA, 2005)	9
Figure 07 : Schéma de la paroi et de la membrane cellulaire des bactéries à Gram positif comme le staphylocoque doré (ACHARYA, 2013)	10
Figure 08 : Schéma de représentation des acides téichoïques dans la paroi des bactéries à Gram positif (BROWN <i>et al.</i> , 2013)	11
Figure 09 : Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> et leur cinétique de production au cours du développement de l'infection (LOWY <i>et al.</i> , 1998)	16
Figure 10 : Histoire de la résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques (LOWY, 2003)	18
Figure 11 : Mode d'action des antibiotiques (CHAUSSADE <i>et al.</i> , 2013)	20
Figure 12 : Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques (ALEKSHUN et LEVY, 2007)	21
Figure 13 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006)	23
Figure 14 : Résistance aux bêta-lactamines chez les <i>Staphylocoque</i> (MAINARDI, 2015)	24
Figure 15 : Mécanismes courants de résistance à la tétracycline (HOBSON <i>et al.</i> , 2021)	25
Figure 16 : Mécanismes de résistance bactérienne aux MLSB (THUMU et HALAMI, 2012)	26
Figure 17 : Composition du biofilm (LISTER et HORSWILL, 2014)	27
Figure 18 : Processus régissant la formation du biofilm (BREYERS et RATNER, 2004)	30
Figure 19 : Micrographies en microscopie électronique à balayage de la structure du biofilm de <i>S. aureus</i> (KONG <i>et al.</i> , 2018)	32
Figure 20 : Représentation des différents types de biofilms staphylococciques (ZAPOTOCZNA <i>et al.</i> , 2016)	33
Figure 21 : Dispersion d'un biofilm mature (AUMERAN <i>et al.</i> , 2020)	34
Figure 22 : Les trois mécanismes de résistance du biofilm aux antibiotiques (STEWART, 1996)	

.....	37
Figure 23 : Une coupe transversale d'une sonde urinaire en silicone à demeure. L'image montre l'incrustation de la sonde par un biofilm (STICKLER, 2008)	39
Figure 24 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques (BELLIFA, 2014)	40
Figure 25 : Méthode des tubes (KIRMUSAOGLU, 2019)	40
Figure 26 : Culture sur la gélose Rouge Congo (HOU <i>et al.</i> , 2012)	41
Figure 27 : Le protocole du Biofilm Ring Test (AZEREDO <i>et al.</i> , 2016)	41
Figure 28 : Prétraitement des échantillons pour observation MEB (ASAHI <i>et al.</i> , 2015)	43
Figure 29 : Micrographes de biofilm obtenus au MEB (A) (DONLAN et COSTERTON, 2002) et (B) montrant l'effondrement de la matrice organique provoqué par la déshydratation de l'échantillon (FLEMMING, 2008)	43
Figure 30 : Communauté bactérienne intégrée dans une matrice de biofilm visualisée par CLSM. Chaque bactérie observée avec une couleur distincte située à différentes profondeurs du biofilm (MADIGAN <i>et al.</i> , 2015)	44
Figure 31 : Principales étapes de la méthode d'hybridation in situ par fluorescence (WOLF, 2017)	45
Figure 32 : Antibiogramme standard par méthode de diffusion de disque sur gélose	49
Figure 33 : Méthode de plaque de culture de tissus	51
Figure 34 : A, culture sur BHIB. B, aspect des colonies de <i>S. aureus</i> sur la gélose BHA (photo prise au laboratoire)	52
Figure 35 : Fréquence de résistance des souches <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	53
Figure 36 : Profil de résistance d'une souche SARM d'origine animale	55
Figure 37 : Profil de résistance d'une souche SARM d'origine alimentaire	55
Figure 38 : Répartition des souches SARM en fonction de la nature du produit	56
Figure 39 : Production de Slime chez les souches <i>S. aureus</i> sur la gélose au rouge de congo, (A) souche non productrice de slime et (B) souche productrice du slime	57
Figure 40 : Répartition des souches en fonction de la production de slime bactérien	58
Figure 41 : Formation de biofilm sur la microplaque chez des souches de <i>S. aureus</i> d'origine alimentaire après coloration au cristal violet	58
Figure 42 : Formation de biofilms sur la microplaque chez des souches de <i>S. aureus</i> d'origine animale après coloration au cristal violet	59
Figure 43 : Distribution des souches <i>S. aureus</i> formatrice de biofilm d'origine alimentaire et animale	60

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus est un germe commensal de la peau et des muqueuses, en particulier les narines et les voies gastro-intestinales de l'homme et des animaux (KIM *et al.*, 2014).

En revanche, il fait également partie des principaux agents pathogènes universels qui provoque une grande variété de maladies (THAMMAVONGSA *et al.*, 2015), allant des infections courantes telles que les infections de la peau et des tissus mous (JOHNSON, 2011), à des infections graves comme la septicémie, l'endocardite, la pneumonie, les infections du système nerveux central (LOWY, 1998) et les toxinoses, telles que le syndrome du choc toxique (JOHNSON, 2011). La capacité de *S. aureus* à coloniser et à infecter différents sites du corps est liée à la présence de divers facteurs de virulence (TAM et TORRES, 2019), comprenant les protéines de surfaces, la capsule, les enzymes et les toxines (DE BOER *et al.*, 2009 ; PETINAKI et SPILIOPOULOU, 2012).

De nos jours, le traitement et le contrôle des infections bactériennes s'effectue principalement par l'antibiothérapie. Ces agents antimicrobiens sont largement utilisés, non seulement en médecine humaine et en médecine vétérinaire, mais aussi en élevages des animaux et certaines activités agricoles (KLUYTMANS *et al.*, 2010). Ils sont administrés aux animaux pour accélérer leur croissance, prévenir et traiter les différentes infections (JAMALI *et al.*, 2015). L'utilisation abusive et non modérée de ces agents antimicrobiens a mené vers l'émergence de souches multirésistantes, un problème de grande ampleur notamment pour les pays développés (HOSEIN *et al.*, 2014 ; RAD *et al.*, 2015), en termes de morbidité, de mortalité, de l'échec thérapeutique et des coûts qu'il peut causer (CASTRO *et al.*, 2016).

La multirésistance de *S. aureus* est assez commune dans les milieux hospitaliers et les fermes (SAKOULAS et MOELLERING, 2008), où elle fut détectée chez les animaux (LEE, 2003) et les aliments comme la viande (NORMANNO *et al.*, 2007 ; PESAVENTO *et al.*, 2007), le lait et les produits laitiers (PELES *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2009), ainsi que les produits de la pêche (BELENEVA, 2011).

Même si les bactéries sont capables de vivre librement dans un environnement (vie planctonique), l'agglomération dans une structure pluri-microbienne regroupés sous le terme de biofilm représente leur mode de croissance le plus fréquent (SEGHIR *et al.*, 2016). Les biofilms sont des populations organisées de bactéries encapsulées dans une matrice polymérique extracellulaire autoproduite (CRAFT *et al.*, 2019), qui adhère à une variété de surfaces biotiques et abiotiques (KRANJEC *et al.*, 2021). Les biofilms microbiens sont à l'origine de plus de 75% de toutes les infections microbiennes observées chez l'homme (DAVIES, 2003), à savoir les infections aiguës, qui sont généralement causées par des cellules planctoniques (GORDON

et LOWY, 2008). En revanche, les infections chroniques sont associées à un mode de croissance du biofilm où *S. aureus* peut se fixer et persister sur les tissus de l'hôte (BARRETT et ATKINS, 2014 ; CHATTERJEE *et al.*, 2014). Cette formation de biofilm permet à la bactérie d'échapper aux défenses de l'organisme de l'hôte et de la protéger du traitement antibiotique, rendant les infections par biofilm particulièrement difficiles à éradiquer (BHATTACHARYA *et al.*, 2015 ; VENKATESAN *et al.*, 2015). Il a été démontré que ces structures sont la source de problèmes de biocontamination dans divers domaines tels que l'environnement et l'industrie (DUBOIS-BRISSONNET *et al.*, 2006), y compris l'industrie agroalimentaire contaminant ainsi les produits alimentaires et générant la biodétérioration des matériaux (KLINGER *et al.*, 2005). De plus, le biofilm contribue à un niveau supplémentaire de complexité concernant le problème de la résistance aux antimicrobiens (CRAFT *et al.*, 2019).

Le but de la présente étude était d'étudier phénotypiquement la formation de biofilm des souches de *S. aureus* d'origine alimentaire et animale, en appliquant deux méthodes couramment décrites dans de nombreux travaux sur les biofilms : la méthode de coloration au cristal violet (CV) sur microplaque et la méthode de culture sur la gélose au rouge congo (RCA), ainsi que d'évaluer la sensibilité des souches de *S. aureus* vis-à-vis de certaines familles d'antibiotiques utilisées en thérapeutiques vétérinaires et humaines, dans le but de détecter les souches SARM.

Synthèse des données bibliographiques

Chapitre I
Généralités sur *Staphylococcus*
aureus

I- Généralités sur *Staphylococcus aureus*

I-1- Historique

Les premières descriptions des staphylocoques (bactéries en forme de coques) isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871, mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878, Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine (KARTHIK, 2007).

Ce n'est que plus tard, en 1882 que le nom "Staphylocoque" a été donné par le chirurgien Ogston, pour décrire ces grains (*kokkos*), groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (*Staphylos*) (EYKIN, 1996). Il différencie ainsi *Staphylococcus* (cocci en grappe) de *Streptococcus* (cocci en chainettes) (SPICER, 2003 ; STEPHEN et HAWKEY, 2006).

En 1884, en Allemagne Rosenbach donne la première description du genre *Staphylococcus* en obtenant des cultures pures de ces bactéries sur milieu solide. Il différencie ainsi *S. aureus* de *S. albus* par la coloration des pigments produits par les colonies (blanches ou Dorées) (KARTHIK, 2007). En 1885, Zopf a placé les staphylocoques et les microcoques dans le genre *Micrococcus* séparés par la suite par Flugge et ces collaborateurs (1955) qui classent les cocci anaérobies facultatifs et aérobies dans le genre *Staphylococcus* et *Micrococcus*, respectivement. Cette classification est basée sur leur action vis-à-vis de la gélatine et le test d'oxydation-fermentation du glucose. Une nette distinction basée sur la composition de l'ADN entre les deux genres a été proposée par Silvestri et Hill en 1965. Le pourcentage en bases G+C de l'ADN des microcoques est de 63-73%, comparé à celui des staphylocoques (30-39%), indiquant qu'il n'existe pas de relation entre les deux genres (STEPHEN et HAWKEY, 2006).

L'introduction de techniques génomiques en 1976 a permis la vérification de certaines classifications tout en engendrant de nombreuses modifications, amenant progressivement à la taxonomie actuelle (HILL, 1981).

I-2- Taxonomie

La classification des staphylocoques a connu de nombreux bouleversements lors de la première édition en 1923 du « Bergey's Manual of Determinative Bactériology », les staphylocoques étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae* (AVRIL et FAUCHERE, 2002), puis dans la famille des *Micrococcaceae* à cause de certaines similitudes phénotypiques avec le genre *Micrococcus*, à savoir, ce sont des cocci à Gram+, non sporulés, non capsulés, immobiles, formant des amas irréguliers et produisant une catalase. Cependant,

il y a une différence majeure dans le métabolisme de ces deux genres. En effet, les *Micrococcus* sont aérobies stricts, tandis que les *Staphylococcus* sont des aéro-anaérobies facultatifs (PELLERIN *et al.*, 2010). En plus, l'analyse de la composition chimique de la paroi montre que celle de *Staphylococcus* est caractérisée par la présence de ponts pentaglycines dans le peptidoglycane, ce qu'on ne trouve pas chez les *Micrococcus* (DE BUYSER et SUTRAT, 2005).

Avec l'avènement de la biologie moléculaire et les techniques de séquençage, l'analyse de la composition en (G+C)% du génome des deux genres et la comparaison des séquences de l'ARNr 16S ont confirmé la nécessité de séparer ces deux genres dans deux familles différentes, ce qui s'est réalisé dans la deuxième édition du Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (PRESCOTT *et al.*, 2002). Selon cette deuxième édition, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est la suivante (DELARRAS, 2007) :

Domaine : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Selon LE LOIR et GAUTIER (2010), les espèces du genre *Staphylococcus* sont classées en deux groupes selon leurs capacités à produire ou non une coagulase libre active sur le plasma oxalaté de lapin :

- Les Staphylocoques à coagulase négative (SCN) tel que *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*... etc.
- Les Staphylocoques à coagulase positive (SCP), renferment les espèces suivantes : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*.

L'espèce *S. aureus*, sans doute la plus connue et la plus communément liée aux pathologies de l'homme, compte deux sous-espèces à savoir *S. aureus* subsp *aureus* et *S. aureus* subsp *anaerobius*. La première, constituant la majorité des souches appartenant à cette espèce, est catalase positive, tandis que la deuxième est catalase négative (PELLERIN *et al.*, 2010).

I-3- Habitat

I-3-1- Chez l'être vivant

Staphylococcus aureus fait partie de la flore commensale normale des mammifères et des oiseaux, à l'inverse de certaines espèces de staphylocoques qui ont, eux un hôte préférentiel.

S. aureus semble capable de coloniser tous les mammifères (marins et terrestres) même si différents biotypes de souches de *S. aureus* pourraient être raccordés à des hôtes spécifiques (HENNEKINE *et al.*, 2003).

Chez l'homme, On repère *S. aureus* sur plusieurs sites corporels tels que la surface de la peau (LAYS, 2012 ; REBAIHI, 2012), les muqueuses intestinales ou génitales (ROBERT, 2013), au niveau des zones chaudes et humides de l'organisme telles que le rhinopharynx (fosses nasales et gorge), les aisselles (EL-ANZI, 2014), les glandes de la peau, le cuir chevelu, les mains, la bouche, les dents, il est également présent dans le tube digestif et le périnée en plus faible quantité (PEREZ, 2013)(figure 01).

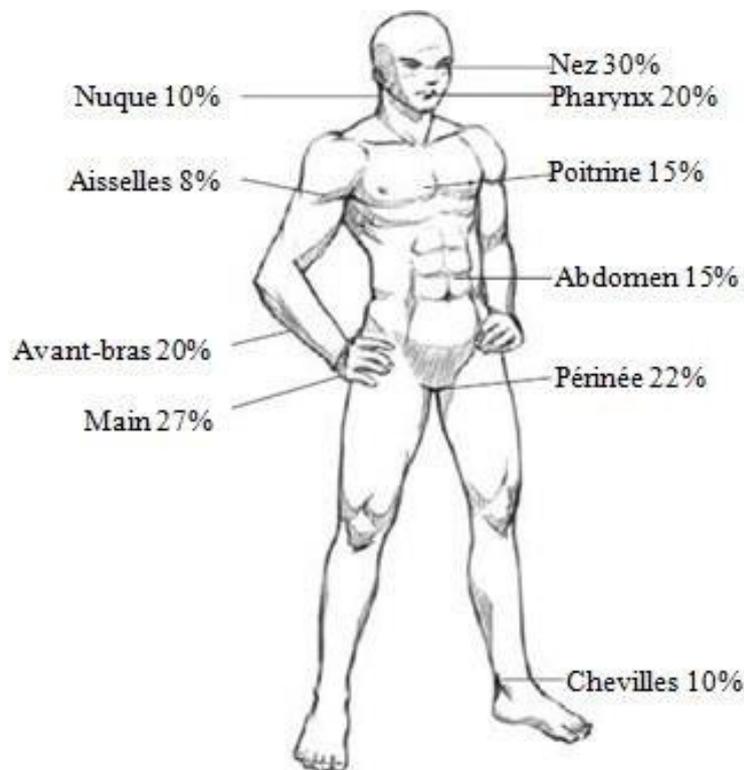


Figure 01 : Prévalence de *S. aureus* dans les différentes parties du corps humain (VERBRUGH, 2009).

I-3-2- Dans l'environnement

Le *S. aureus*, une bactérie très répandue sur la planète bleue de façon ubiquitaire. Il possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et donc capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux. La bactérie peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer et la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (DWORKIN *et al.*, 2006). Elle peut également survivre sur des surfaces inanimées telles que la literie, les vêtements et les poignées de portes (FREEMAN et FREEMAN, 2006).

I-3-3- Dans les aliments et leur environnement de production

La bactérie peut se retrouver dans les aliments, leur contamination peut être due principalement à la matière première qui est contaminée ou d'origine humaine lors de la fabrication et/ou le conditionnement de l'aliment dans l'industrie agro-alimentaire (CALLON *et al.*, 2007). Ces contaminations sont souvent liées à un défaut d'hygiène du matériel de production ou de l'employé (ASAO *et al.*, 2003 ; IKEDA *et al.*, 2005).

I-4- Mode de transmission

En raison de sa localisation, c'est principalement le mode de transmission manuportée qui est à l'origine des infections. Cette transmission peut être due soit à un portage direct par l'individu lui-même, soit par une contamination transitoire via un autre réservoir (PASCOE *et al.*, 2014). Elle est favorisée par la promiscuité dans les lieux collectifs tels que les salles de sport, les écoles, les prisons et sur les lieux de travail. Une transmission intra-familiale est possible et décrite (KNOX *et al.*, 2015).

Bien que *S. aureus* soit capable de survivre plusieurs mois dans l'environnement en état de dormance (MULYUKIN *et al.*, 2014), la contamination par une source environnementale reste relativement rare, sauf en milieu hospitalier où elle est prévalente (KAMPF *et al.*, 2003).

Une autre voie de contamination est l'ingestion d'aliments colonisés par des souches de *S.aureus* libérant des entérotoxines responsables d'intoxinations alimentaires (SOARES *et al.*, 1997).

I-5- Caractères bactériologiques

I-5-1- Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, le *Staphylococcus aureus* se présente sous l'aspect de cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5 μ de diamètre (figure 02), ce n'est qu'au cours de la lyse ou la dégénérescence (veilles cellules), que parfois les cellules perdent leur affinité tinctoriale et peuvent devenir à Gram variable (COUTURE, 1990), immobiles, non sporulés (LE LOIR et GAUTIER, 2010), ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (ANANTHANARAYAN et PANIKER, 2006) (figure 03).

La grande majorité des souches sont capsulées *in vivo* mais perdent progressivement leur capsule en culture, d'autres forment des colonies mucoïdes sont entourées d'une pseudocapsule (FAUCHERE et AVRIL, 2002 ; DE BUYSER et SUTRAT, 2005).

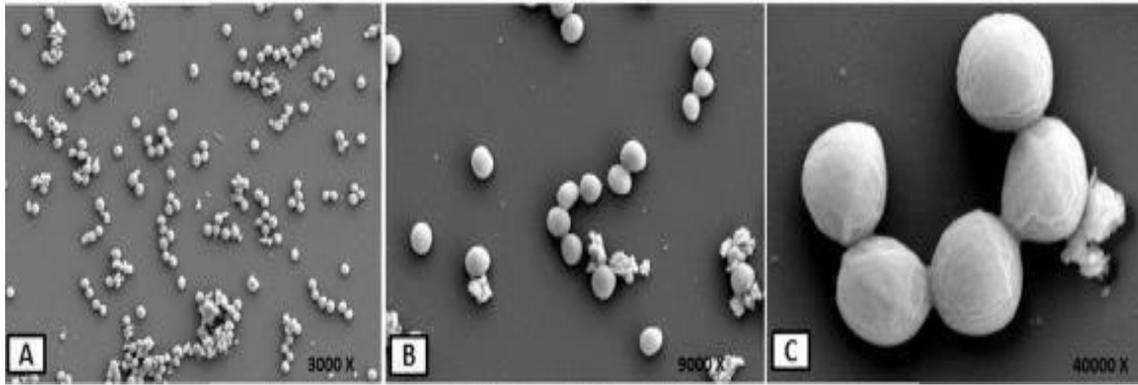


Figure 02 : Visualisation de *S. aureus* en microscopie à balayage à différents grossissements (MERGHNI *et al.*, 2017).

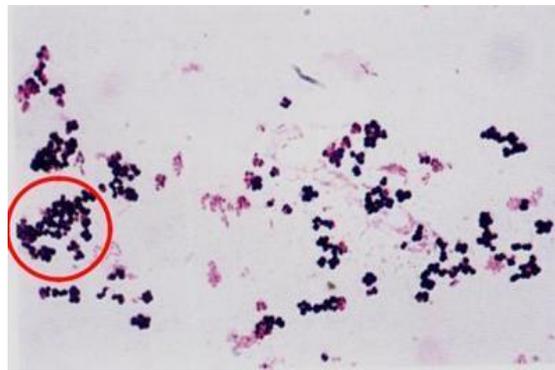


Figure 03 : Staphylocoques en amas (SPICER, 2003).

I-5-2- Caractères cultureux

In vitro, *S. aureus* est une bactérie non-exigeante. En effet, en plus d'être aéroanaérobie facultative, elles sont capables de croître dans des conditions hostiles (par exemple en bouillon hypersalé à 7% de NaCl) (ACCARIAS, 2014), ce caractère est parfois mis à profit (surtout en bactériologie alimentaire) (YVES *et al*, 2009). *S. aureus* est facilement cultivable sur des milieux ordinaires synthétiques contenant les facteurs indispensables à sa croissance, à savoir, la thiamine, l'acide nicotinique, la cystéine et l'arginine (DE BUYSER et HENNEKINNE, 2010), tel que CBA (Columbia Blood Agar), TSA (Tryptic Soy Agar) ou BHI (Brain Heart infusion), ainsi que dans les milieux liquides correspondants (VITKO et RICHARDSON, 2013). En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène abondant avec dépôt et voile en surface sont observés (LE MINOR et VERON, 1990). Il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (ANGANDZA, 2012).

C'est un germe mésophile pouvant croître à des températures allant de 6 à 48°C, avec un optimum qui se situe entre 35 et 41°C, son pH optimal est compris entre 6 et 7, mais il peut se multiplier dans une fourchette de pH comprise entre 4 et 9,8 (DE BUYSER et SUTRAT,

2005).

Il tolère une activité de l'eau (a_w) exceptionnellement basse pour une bactérie, puisque sa croissance est inhibée à partir de valeurs comprises entre 0,95 et 0,91 et qu'il est capable de survivre sans se multiplier à des valeurs proches de 0,85 (DE BUYSER et SUTRAT, 2005). Halotolérant, il peut supporter des teneurs en chlorures de sodium (NaCl) pouvant atteindre les 20% (DE BUYSER et SUTRAT, 2005).

Sur milieux solides, les colonies observées après 24 heures d'incubation sur gélose ordinaire sont larges (2-4 mm de diamètre), circulaires à bords réguliers, légèrement bombées lisses, luisantes et translucides. La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou jaune orangé (ANANTHANARAYAN et PANIKER, 2006 ; DENIS et POLY, 2007).



Figure 04: Culture de *S. aureus* sur milieu TSA (KAISER, 2017).

Sur gélose au sang, les souches typiques de *S. aureus* peuvent produire des colonies de grand diamètre que celles produites sur gélose nutritive et de couleur jaune doré, entourées d'une hémolyse bêta (COUTURE, 1990 ; DENIS et POLY, 2007) (figure 05).



Figure 05 : croissance de *Staphylococcus aureus* sur gélose au sang (CHEN *et al.*, 2014).

L'isolement de *S. aureus* se fait sur des milieux hyper-salés comme le milieu Chapman (7,5% de NaCl), ou des milieux contenant de puissants inhibiteurs, comme le milieu Baird Parker ou le milieu plasma de lapin au fibrinogène (JOFFIN et JOFFIN, 2010) (figure 06).

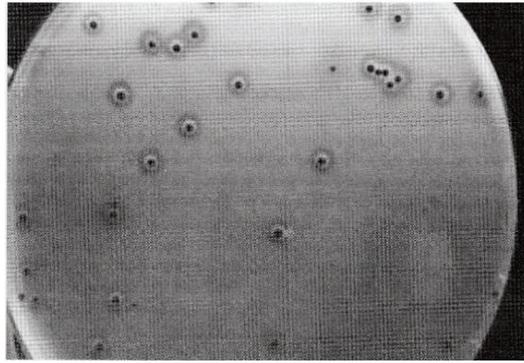


Figure 06 : colonies caractéristiques de *S. aureus* sur milieu de Baird Parker (DE BUYSER et SUTRA, 2005).

I-5-3- Caractères physiologiques et biochimiques

S. aureus est chimioorganotrophe, aéroanaérobie facultatif, produit une catalase mais pas d'oxydase (LARPENT, 2000). Les *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, VP +, MR +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (FRENEY *et al.*, 1999).

La plupart des souches sont lipolytiques produisant une zone opaque lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux contenant le jaune d'œuf (ANANTHANARAYAN et PANIKER, 2006). De plus, les souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta (COUTURE, 1990).

S. aureus possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser divers substrats glucidiques (glucose, saccharose, lactose et mannitol), protéiques et lipidiques (FERRON, 1992).

Globalement, l'espèce *S. aureus* peut être différenciée des autres staphylocoques par la présence simultanée d'une coagulase et d'une thermonucléase (DNase) (FAUCHERE et AVRIL, 2002).

I-6- Facteurs de virulence et pathogénicité

I-6-1- Constituants de l'enveloppe

I-6-1-1- Exopolysaccharides capsulaires

L'interaction de *S. aureus* avec son hôte dépend fortement de ses propriétés de surface, la majorité des isolats de *S. aureus* dites capsulées expriment un polysaccharide de surface durant la phase de croissance post-exponentielle (O'RIORDAN et LEE, 2004).

Une classification de ces polysaccharides en 11 sérotypes capsulaires a été proposée dont les types 5 et 8 représentent 80% des infections humaines (ROUX et GHIGO, 2006 ; DUBAS, 2008).

La capsule facilite l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes en induisant la sécrétion par ces cellules de cytokines inflammatoires telles que IL-1 β , IL6, TNF α et IFN γ et la chimiokine IL-8 (SOELL *et al.*, 1995 ; NILSSON *et al.*, 1997), elle empêche aussi les neutrophiles de la recouvrir lors du phénomène d'opsonisation et capable d'interférer avec la phagocytose des *S. aureus* (THAKKER *et al.*, 1998), et confère à la bactérie une forme de résistance vis-à-vis des antibiotiques (DEVERRIERE, 2007).

I-6-1-2- Composants de la paroi

Elle est formée du peptidoglycane, des acides teichoïques et lipoteichoïques (VANDENESCH *et al.*, 2003) (figure 07).

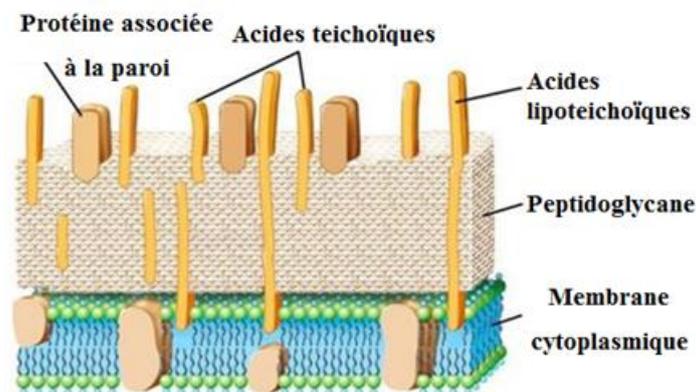


Figure 07 : Schéma de la paroi et de la membrane cellulaire des bactéries à Gram positif comme le staphylocoque doré (ACHARYA, 2013).

I-6-1-2-1- Peptidoglycane ou mucopeptide

C'est l'élément structural de base de la paroi bactérienne. Il forme un réseau macromoléculaire plus au moins continu autour de la membrane cytoplasmique. Ce réseau est formé de chaînes de glycane reliées entre elles par des chainons peptidiques. Il lie la plupart des protéines d'adhérence (LECLERC *et al.*, 1995).

La paroi cellulaire de *S. aureus* est très riche en peptidoglycane, sa structure particulière la rend insensible au lysozyme et favorise sa survie à l'intérieur des phagosomes (TAWK, 2014). Le peptidoglycane de *S. aureus* est formé de chaînes linéaires de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) réunis par des liaisons β (1-4) et β (1-6). Sur l'acide N-acétylmuramique (NAM) se fixe un térapeptide, des ponts penta ou hexa-glycines unissent la lysine d'un térapeptide à l'alanine du suivant (BOSGIRAUD, 2003).

Chez *S. aureus*, la production de grandes quantités de peptidoglycane lors d'infection locale (abcès, infections articulaires) provoque un chimiotactisme des cellules phagocytaires et libération de cytokines (IL-1, 6, 8, et TNF α) qui, en grande quantité, provoquent les lésions

tissulaires et hyperthermie (AVRIL *et al.*, 2003 ; GARRITY *et al.*, 2007).

I-6-1-2-2- Acides teichoïques et acides lipoteichoïques

Deux types d'acides teichoïques ont été identifiés, ceux qui sont covalamment attachés au peptidoglycane et les acides lipoteichoïques qui sont liés à la membrane plasmique (PERCY et GRÜNDLING, 2014 ; RAJAGOPAL et WALKER, 2015) (figure 08).

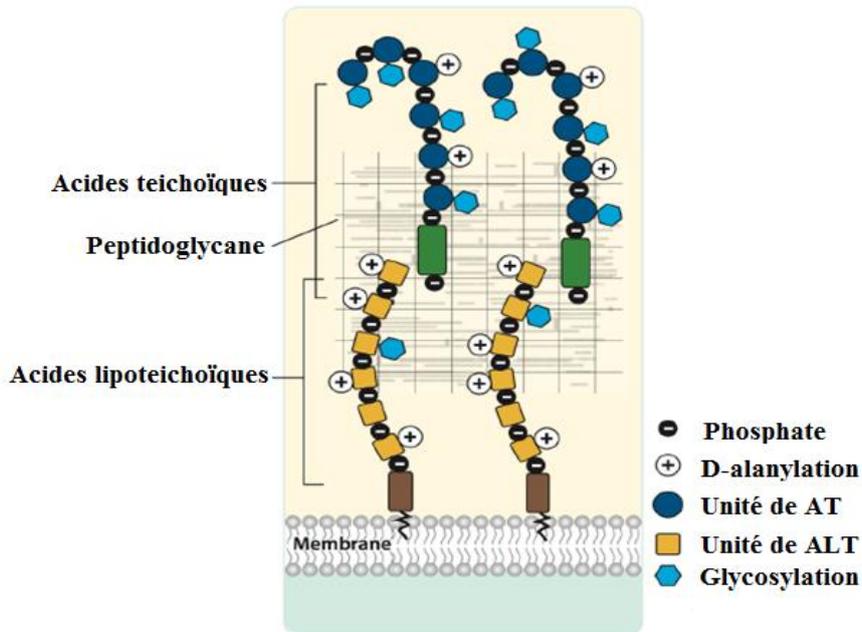


Figure 08 : Schéma de représentation des acides téichoïques dans la paroi des bactéries à Gram positif (BROWN *et al.*, 2013).

Les acides teichoïques sont des polymères linéaires de ribitol ou de glycérol (*S. aureus* possède de l'acide ribitol-teichoïque), représentant environ 40% du poids de la paroi bactérienne, unis par des liaisons phosphodiester et substitués selon les cas par de la N-acétylgalactosamine, la position des liaisons détermine l'existence des anomères α ou β (LE MINOR et VERON, 1982). Les acides teichoïques de *S. aureus* sont aussi appelés polysaccharides A, ce sont des médiateurs cellulaires importants dans les processus inflammatoires qui caractérisent les réponses immunitaires en réaction aux infections des bactéries à Gram positif (KARTHIK, 2007). Ce polymère permet à *S. aureus* d'adhérer de manière spécifique aux surfaces muqueuses et favorisent ainsi la colonisation (BILJANA *et al.*, 2015).

Les acides lipoteichoïques de *Staphylococcus aureus* sont composés en alternance de groupes phosphate et de groupes glycérol (NAVARRE et SCHNEEWIND, 1999). Ils jouent un grand rôle dans les interactions entre bactéries et cellules et dans la fixation des bactériophages (SPICER, 2003). Ils sont responsables de la résistance aux lysosomes et aux

peptides antimicrobiens ainsi que de l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte. Outre la fermeté et l'élasticité de la paroi cellulaire, les acide teïchoïques ont d'autres activités biologiques telles que l'inhibition de la chimiotaxie (BILJANA *et al.*, 2015), l'activation du complément (TALLY, 1993) et peuvent entraîner une hypersensibilité (LE MINOR et VERON, 1990).

I-6-2- Protéines de surfaces

I-6-2-1- Protéine A

La paroi cellulaire de *S. aureus* contient une protéine A unique qui est liée au peptidoglycane, mais elle est libérée dans le milieu de culture au cours de la croissance (BILJANA *et al.*, 2015). Cette protéine a la capacité de se lier au fragment Fc de l'immunoglobuline G (IgG), le complexe formé permet l'activation du complément par la voie classique, ce qui altère le bon fonctionnement des immunoglobulines en empêchant l'opsonisation par la réduction du nombre de fragments Fc disponibles (TALLY, 1993 ; PLATA *et al.*, 2009). Elle inhibe aussi la phagocytose des microorganismes par les cellules polynucléaires (BILJANA *et al.*, 2015). Elle module l'agrégation des plaquettes (O'BRIEN *et al.*, 2002) via l'interaction avec le facteur Von Willebrand, glycoprotéine du plasma intervenant dans l'adhésion des plaquettes au niveau de l'endothélium vasculaire lésé, cette liaison est impliquée dans les endocardites infectieuses à *S. aureus* (HARTLEIB *et al.*, 2000 ; O'SEAGHDHA *et al.*, 2006).

I-6-2-2- Facteurs d'invasion et d'adhésion

L'adhésion constitue l'étape initiale d'une infection. *S. aureus* est capable de se fixer sur les protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte selon deux mécanismes. Le premier est médié par des forces physicochimiques incluant des liaisons hydrophobes. Un second mécanisme spécifique met en jeu des adhésines (MAZMANIAN *et al.*, 1999).

I-6-2-3- Adhésines ancrées dans la paroi (MSCRAMM)

Les MSCRAMM (Microbial Surface Components Reconizing Adhesive Matrix Molecules) sont des protéines associées au peptidoglycane (PDG) de la bactérie par des liaisons covalentes. Ces adhésines sont responsables de l'attachement de la bactérie à différentes matrices extracellulaires comme le collagène, le fibrinogène ou la fibronectine et initient la colonisation (PATTI et HOOK, 1994 ; FOSTER et HOOK, 1998). Il existe une vingtaine de MSCRAMM chez *S. aureus* dont les principales sont : les protéines de liaison à la fibronectine, FnbA et B (Fibronectin binding protein A et B) (JONSSON *et al.*, 1991), la protéine de liaison au collagène, Cna (collagen binding protein) (SWITALSKI *et al.*, 1989),

ainsi que les protéines de liaison au fibrinogène ClfA et ClfB (clumping factor A et B) (NI EIDHIN *et al.*, 1998).

I-6-2-4- Protéine de liaison au collagène (Cna)

La protéine *Cna* de *S. aureus* permet l'adhésion aux tissus contenant du collagène comme le cartilage (PATTI *et al.*, 1994). Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (BUCKINGHAM *et al.*, 2004).

I-6-2-5- Protéine de liaison au fibrinogène (ClfA et ClfB)

C'est une protéine de surface très riche en lysine qui paraît être fixée au corps bactérien appelée coagulase liée ou "clumping factor" qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma, permettant de transformer directement le fibrinogène en fibrine (VERDIER *et al.*, 2000). La protéine ClfA est présente à tous les stades de croissance, contrairement au ClfB, qui est seulement présente à la surface des cellules en phase exponentielle de croissance (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

I-6-2-6- Protéine de liaison au fibronectine (FnBA et FnBB)

La fibronectine est une glycoprotéine qui se trouve dans la matrice extracellulaire (sous forme insoluble) et dans le plasma (sous forme soluble) (MENZIES, 2003). FnBPA et FnBPB contribuent à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques et aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Ils ont ainsi un rôle important dans l'initialisation des infections sur des corps étrangers (FOSTER et MCDEVITT, 1994).

I-6-2-7- Adhésines sécrétées (SERAM)

De récentes recherches ont montré la présence d'un autre mécanisme d'adhésion qui se base sur des adhésines sécrétées vers le milieu extérieur appelées SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules). Ce groupe inclut les Eap (Extracellular adherence protein), les Emp (Extracellular matrix binding protein), ainsi que les Efb (Extracellular fibrinogen binding protein) (SMELTZER *et al.*, 2009). Ces protéines se fixent par des liaisons non covalentes aux protéines de la matrice extracellulaire (fibrinogène, fibronectine, la prothrombine, collagène,...etc) (CHAVAKIS *et al.*, 2005), puis elles sont reconnues par des récepteurs spécifiques présents à la surface de la bactérie (BOISSET et VANDENESCH, 2010).

I-6-2-8- Protéine Eap

Il facilite sa propre phagocytose par les cellules phagocytaires (HAGGAR *et al.*, 2003), mais aussi de se fixer aux produits de dégradation de la matrice extracellulaire. Ainsi, *S.*

aureus s'attaque de préférence aux tissus lésés et il masque les récepteurs des leucocytes pour limiter leur infiltration. En résumé, Eap inhibe la réaction inflammatoire qu'elle a elle-même provoquée (CHAVAKIS *et al.*, 2002 ; HASSEN *et al.*, 2006).

I-6-2-9- Protéine Efb

Des chercheurs considèrent que la protéine Efb interagit avec le fragment C3 du complément, cette interaction contrecarre l'activation du complément et l'opsonisation (LEE *et al.*, 2004). De plus, elle se lie aux plaquettes et inhibe ainsi l'agrégation plaquettaire (SHANNON *et al.*, 2004).

I-6-3- Substances élaborées par *S. aureus*

Toutes les souches de *S. aureus* produisent des substances excrétées dans le milieu extracellulaire et sont douées soit d'une activité enzymatique, ou d'une activité toxique (BHATIA et ZAHOOOR, 2007).

I-6-3-1- Les enzymes

I-6-3-1-1- Catalase

Elle convertit le peroxyde d'hydrogène accumulé dans la cellule, résultant du métabolisme ou lors de la phagocytose en molécules d'eau et d'oxygène, ce qui empêche la formation de radicaux oxygénés toxiques pour la bactérie (WILLIAM, 2009).

I-6-3-1-2- Coagulase

En se liant à la prothrombine, elle transforme le fibrinogène en fibrine qui recouvre le corps bactériens, ce qui le protège et inhibe sa phagocytose et favorise la dissémination en provoquant la coagulation localisée (MADIGAN et MARTINKO, 2007).

I-6-3-1-3- Désoxyribonucléase thermostable

Elle détruit l'ADN des cellules de l'hôte (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

I-6-3-1-4- Bêta-lactamase

Elle inactive les β -lactamines et joue le rôle dans la résistance vis-à-vis de cette famille d'antibiotiques (COLLOMB, 2011).

I-6-3-1-5- Hyaluronidase

Elle hydrolyse l'acide hyaluronique présent dans la matrice acellulaire du tissu conjonctif dont elle diminue la viscosité, ce qui a pour effet de permettre la diffusion des staphylocoques dans les tissus (EL KOURI *et al.*, 1998 ; AVRIL *et al.*, 2003).

I-6-3-1-6- Fibrinolysine

Elle joue un rôle dans l'activation du plasminogène en plasmine conduisant à la dislocation du thrombus riche en bactéries (BOKAREWA *et al.*, 2006), elle clive aussi les IgG et le fragment C3b du complément afin d'empêcher la phagocytose (BOISSET et

VANDENESCH, 2010).

I-6-3-1-7- Protéases

Elles hydrolysent certaines protéines, telle que la staphylokinase, et contribuent à la destruction du caillot et à la formation de microembolus bactériens, responsables de métastases septiques (MARIANI-KURKDJIAN et BINGEN, 2003).

I-6-3-1-8- Lysosyme

Une endo-bêta-N-acétylglucosaminidase qui provoque la lyse de la paroi bactérienne (LE MINOR et VERON, 1990).

I-6-3-1-9- Lipases et estérases

Elle clive les acides gras de la peau, qui sont secondairement inactivé par l'enzyme FAME (Fatty Acid Modifying Enzym) ce qui favorise la pénétration de la bactérie à travers la barrière cutanéomuqueuse (LONG *et al.*, 2010).

I-6-3-2- Les toxines

Le tableau 1 résume les principales toxines secrétées par *S. aureus* et leur mode d'action.

Tableau 1. Différentes toxines secrétées par *S. aureus* et leur mode d'action (ASSOUS *et al.*, 1999 ; FLANDROIS *et al.*, 2000 ; AVRIL *et al.*, 2000 ; VANDENESCH *et al.*, 2003 ; TRISTAN *et al.*, 2007).

Les toxines	Mode d'action
Les hémolysines (α - toxine ; β - toxine)	Ont une action cytolytique sur de nombreuses cellules eucaryotes et notamment les plaquettes, accessoirement sur les globules rouges humains ou animaux
Leucocidine de Pantone-Valentine (PVL)	Ces toxines ont des cellules cibles (polynucléaires, monocytes, macrophages) sur lesquelles elles se fixent et provoquent la formation de canaux membranaires laissant passer les cations divalents.
Les exfoliatines ou épidermolysines	Provoque sur le plan histologique un décollement intra-épidermique entre le stratum granulosum et le stratum spinosum, créant cliniquement des lésions bulleuses.
Super antigènes	Se lient au CMH de type II et causent une prolifération majeure de lymphocytes T avec production de cytokines.
Entérotoxines	Associées aux intoxications alimentaires ou la toxine est produite dans l'aliment ingéré.
TSST-1 (Toxin Shock Syndrom Toxin 1)	Responsable du syndrome du choc toxique staphylococcique.
Le « Succinic oxydase factor »	Inhibe l'oxydation du succinate par les mitochondries.

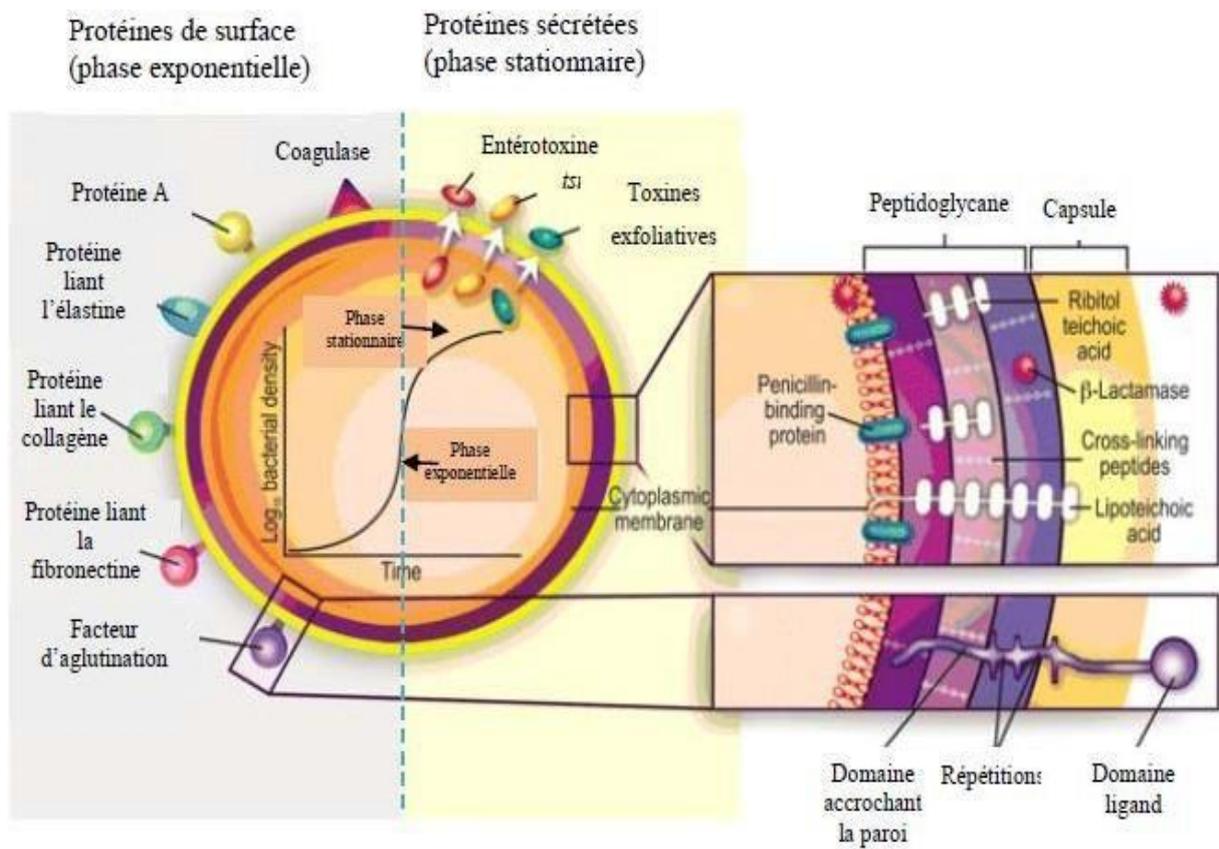


Figure 09 : Facteurs de virulence de *S. aureus* et leur cinétique de production au cours du développement de l'infection (LOWY *et al.*, 1998).

Chapitre II

Antibiorésistance

II- Antibiorésistance

II-1- Historique

S. aureus ne possède aucune résistance naturelle aux antibiotiques (GRUNDMANN *et al.*, 2006). En 1928, le staphylocoque a joué un rôle dans la découverte des antibiotiques. En effet, l'observation fortuite d'Alexander Fleming sur des colonies de *Penicillium* a conduit à l'amélioration de la santé mondiale. Il a remarqué que le champignon *Penicillium* (qui avait contaminé les boîtes de cultures accidentellement) avait inhibé la croissance d'une culture bactérienne qui se trouve être une souche de staphylocoque (BROWN, 2004).

En revanche, cette découverte de Fleming sera tombée dans l'oubli, jusqu'à l'arrivée de deux chercheurs britanniques, Florey et Chain en 1939 qui avaient utilisés la pénicilline en thérapeutique. Le terme antibiotique a été proposé par R. Dubos à la fin de la seconde guerre mondiale, la pénicilline (bêtalactamine) fut employée plus largement pour le traitement des infections bactériennes, mais malheureusement l'usage intensif et non réfléchi de ces molécules d'antibiotiques permet aux bactéries de développer une résistance vis-à-vis de ces molécules (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

En 1941, les staphylocoques résistants à la pénicilline sont apparus grâce à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique, enzyme qui dégrade la pénicilline (DUMITRESCU *et al.*, 2010). *S. aureus* qui possède une très grande plasticité génomique, sous la pression de sélection des antibiotiques, il a très rapidement acquis des gènes portés par des plasmides codant pour ces pénicillinases (GRUNDMANN *et al.*, 2006).

Pendant les années 1950, sont apparues les souches de *S. aureus* multirésistantes. L'introduction en 1959 de la méticilline pour le traitement des infections staphylococciques a soulevé un grand espoir (DUMITRESCU *et al.*, 2010). Peu après l'introduction de ce nouvel antibiotique, apparaissent des souches de *S. aureus* résistants que l'on appellera *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) (OTTER et FRENCH, 2010).

Parallèlement à l'émergence des SARM, la consommation des glycopeptides (teicoplanine, vancomycine) a considérablement augmenté. Les premiers rapports sur la résistance aux glycopeptides associée à un échec thérapeutique ont été publiés en 1995 pour la teicoplanine et en 1997 pour la vancomycine. Les SARM de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont définis par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées pour la vancomycine et la teicoplanine (LOWY, 2003).

L'antibiorésistance est devenue un sérieux phénomène de portée universelle, qui n'a cessé d'augmenter de manière progressive au cours de ces dernières années. Ce problème de santé

publique touche à la fois la santé animale et la santé humaine (FAYE, 2005).

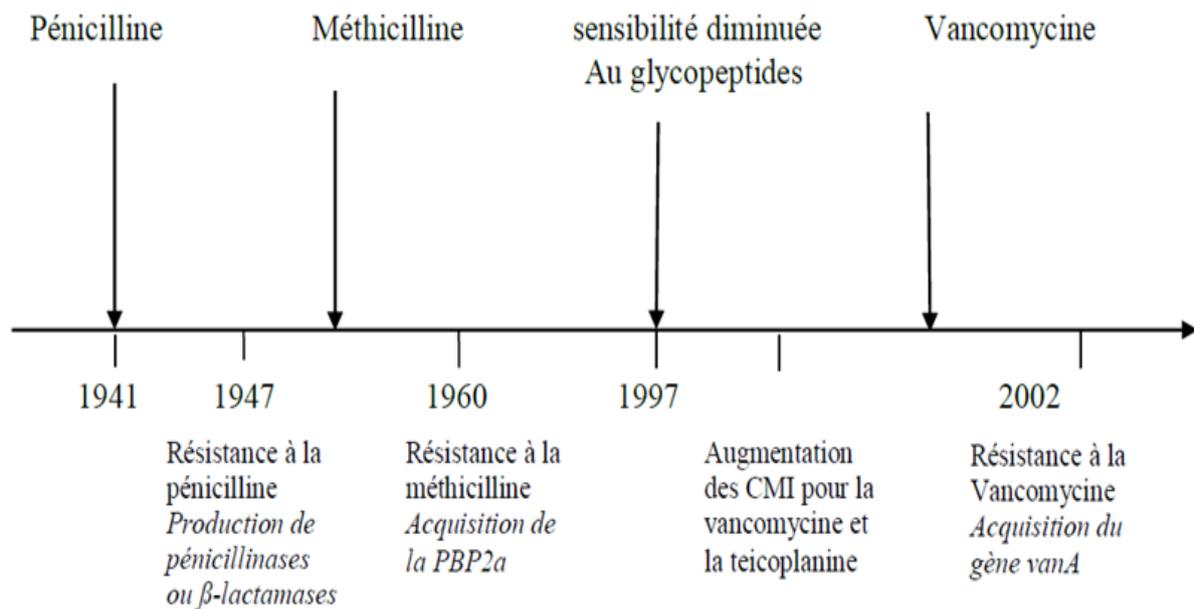


Figure 10: Histoire de la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques (LOWY, 2003).

II-2- Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances naturelles biologiques élaborées par un microorganisme (champignons/bactéries), ou des substances chimiques synthétiques ou semi-synthétiques obtenues par modification d'une molécule de base naturelle (MUYLAERT et MAINIL, 2012; CARUBA et JACCOULET, 2015), qui ont une activité antibactérienne. Certains antibiotiques agissent contre les champignons unicellulaire, ils sont donc appelés antibiotiques antifongiques (JOLY, 1989).

II-3- Critères de classification des antibiotiques

II-3-1-Origine

Naturel : l'antibiotique est produit par des micro-organismes soit des champignons (pénicilline, céphalosporine) ou bien des bactéries (streptomycines, chloramphénicol) (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Semi-synthétique : A partir d'une structure de base obtenue par extraction sur laquelle est greffé un radical chimique (Méthicilline) (BARZIC et IOAN, 2015).

Synthétique : Produit entièrement par voie chimique (Sulfamide, acide nalidixique) (BARZIC et IOAN, 2015).

II-3-2- Spectre d'activité selon GAUDY et BUXERAUD (2005), les antibiotiques sont classés :

Les antibiotiques à large spectre : actif sur la majorité des bactéries Gram positif et Gram négatif.

Les antibiotiques à spectre limité : actif sur les bactéries Gram positif et quelque Gram négatif.

Les antibiotiques étroits : actifs uniquement sur certaines bactéries Gram positif ou certaines à Gram négatif.

II-3-3- Effet d'un antibiotique

Les antibiotiques ont principalement deux actions possibles sur les bactéries, bactériostatiques ou bactéricides.

Un antibiotique bactériostatique est une molécule qui à dose thérapeutique est capable d'inhiber seulement la croissance bactérienne sans perte de viabilité. Le pouvoir bactériostatique est mesuré en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI), la CMI étant la concentration la plus faible d'antibiotique qui est capable d'inhiber la croissance visible des bactéries après 18 heures à 37 °C (FRENEY, 2007).

L'autre possibilité étant que l'antibiotique soit bactéricide, c'est-à-dire une molécule qui à dose thérapeutique est capable de provoquer la mort de la cellule bactérienne. Elle est mesurée en déterminant la concentration minimale bactéricide (CMB), la CMB étant la plus faible concentration d'antibiotique entraînant la destruction de 99,99 % d'un inoculum bactérien (FRENEY, 2007).

II-3-4- Leur structure chimique

Très variable, elle est basée souvent sur une base (exemple : cycle β -lactame) sur laquelle il y a hémi-synthèse, et aussi ils peuvent être classés selon les acides aminés de la matrice suivante : dérivé d'un seul acide aminé (Chloramphénicol) ou de deux acides aminés sous forme de peptide cyclique, complexe glycoprotéique... (BARZIC et IOAN, 2015).

II-3-5- Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les bactéries de diverses manières. Certains empêchent la formation de leurs enveloppes protectrices (membrane et paroi), d'autres substances agissent en bloquant certaines réactions chimiques indispensables à leur métabolisme. Enfin, certains antibiotiques empêchent la traduction de leur information génétique (leurs gènes) en protéines (GAUDY et BUXERAUD, 2005) (figure 11).

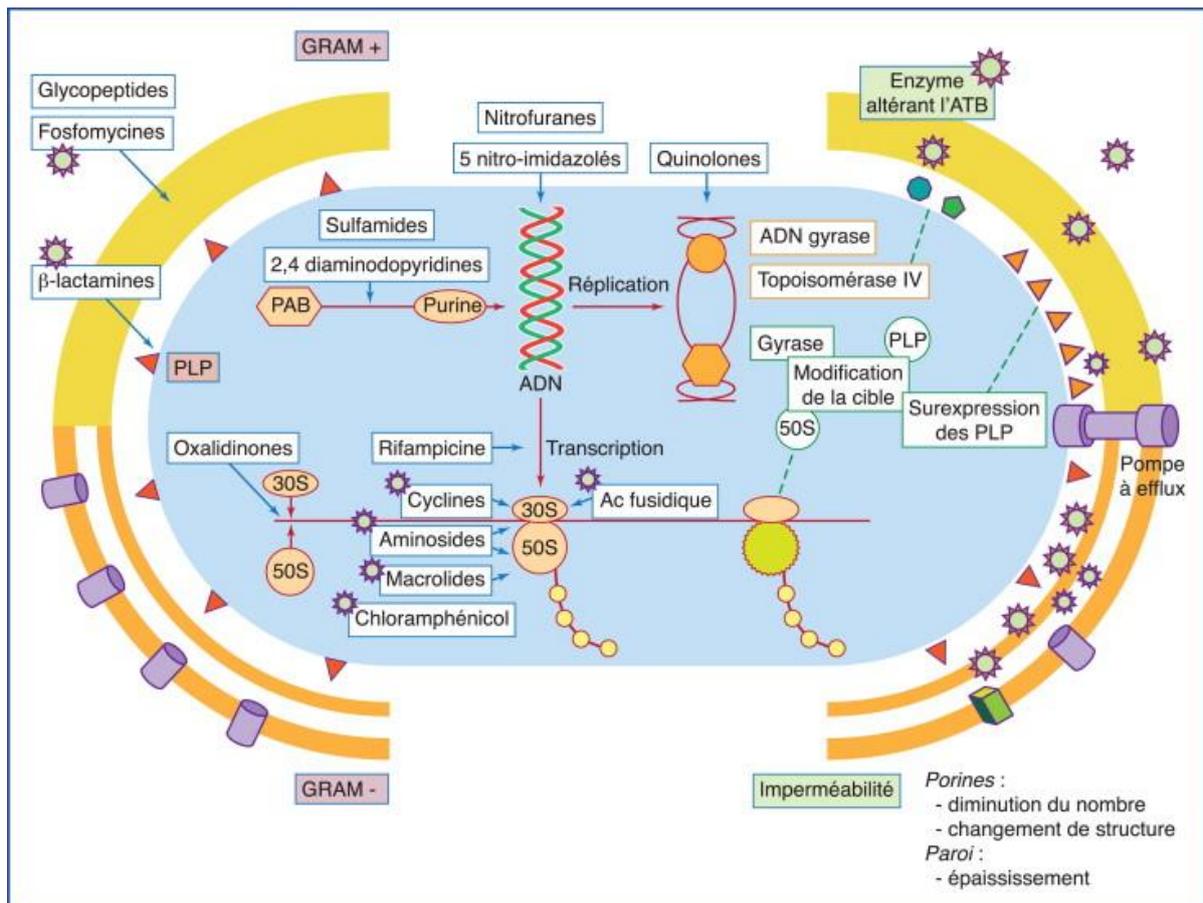


Figure 11 : Mode d'action des antibiotiques (CHAUSSADE *et al.*, 2013).

II-4- Résistance aux antibiotiques

II-4-1- Définition de la résistance bactérienne

Un microorganisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. Les bactéries sont dites multirésistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelles et acquises, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Elles sont alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques (CARLE, 2009 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012).

II-4-2- Support génétique de la résistance bactérienne

La résistance bactérienne peut être naturelle ou acquise :

II-4-2-1- Résistance naturelle

Une résistance intrinsèque se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurale conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactérien (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une molécule particulière ou vis-à-vis d'une classe d'antibiotiques (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006). L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due

à un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne, une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (impermeabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatif aux glycopeptides comme la vancomycine), une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques (résistance aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux quinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*) ou bien à une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

II-4-2-2- Résistance acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce normalement sensible à cet antibiotique, ce qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation chromosomique ou par acquisition horizontale de matériel génétique étranger (CARLE, 2009 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012) (figure 12).

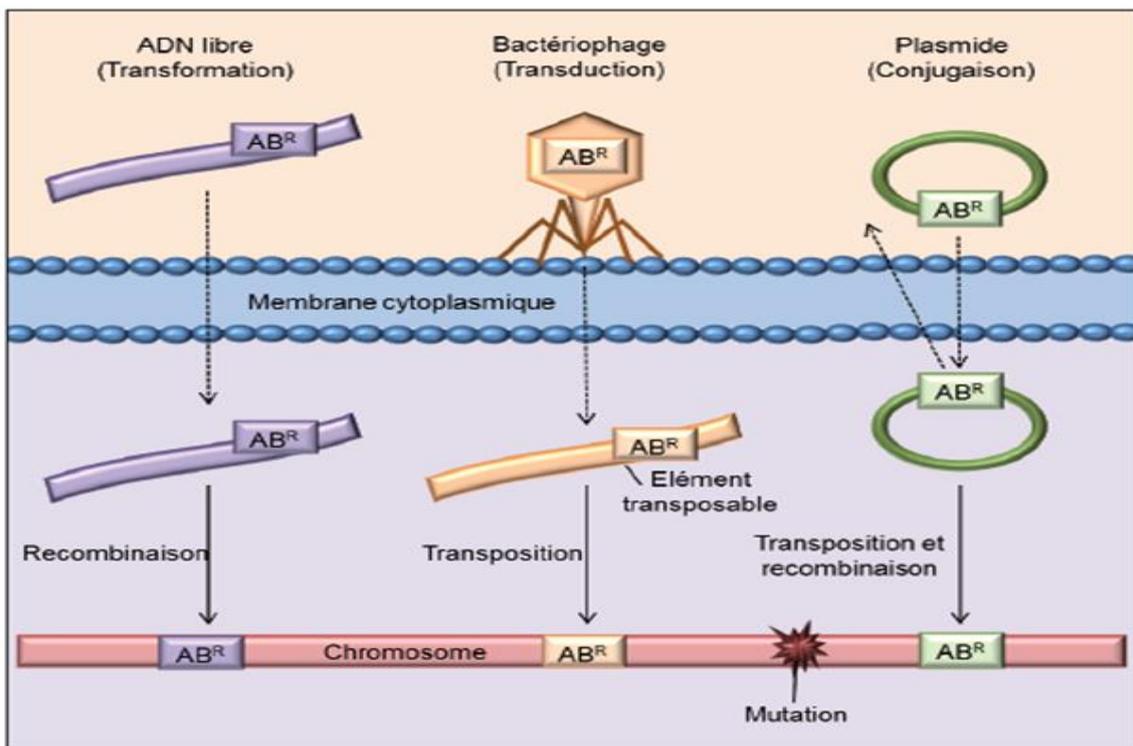


Figure 12: Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques (ALEKSHUN et LEVY, 2007).

II-4-3- Principaux modes de résistances des bactéries

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006) (figure 13).

II-4-3-1- Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une

perte d'activité. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006 ; ALEKSHUN et LEVY, 2007 ; NIKAIDO, 2009).

II-4-3-2- Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. Ce type de résistance peut être le résultat de l'acquisition de matériel génétique mobile (codant pour une enzyme modifiant la cible), ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

II-4-3-3- Réduction de la perméabilité cellulaire

Les bactéries à Gram négatif sont munies d'une enveloppe additionnelle, la membrane externe, qui sert de barrière. Les nutriments et les antibiotiques doivent traverser cette enveloppe pour pénétrer dans la bactérie. Le passage se fait par diffusion passive à travers des protéines transmembranaires nommées porines. La réduction de la perméabilité cellulaire se produit par diminution de l'entrée de l'antibiotique sur son site, provoquée par une modification de la perméabilité de la membrane interne ou externe de la bactérie (CARLE, 2009).

II-4-3-4- Phénomène d'efflux

Outre l'imperméabilité cellulaire, il existe un autre mécanisme qui explique la non accumulation de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule bactérienne, c'est l'excrétion ou l'efflux actif. Ce mécanisme de résistance est médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, qui est un mécanisme nécessitant de l'énergie et utilisé par les bactéries pour expulser des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que les antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible (CARLE, 2009 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012).

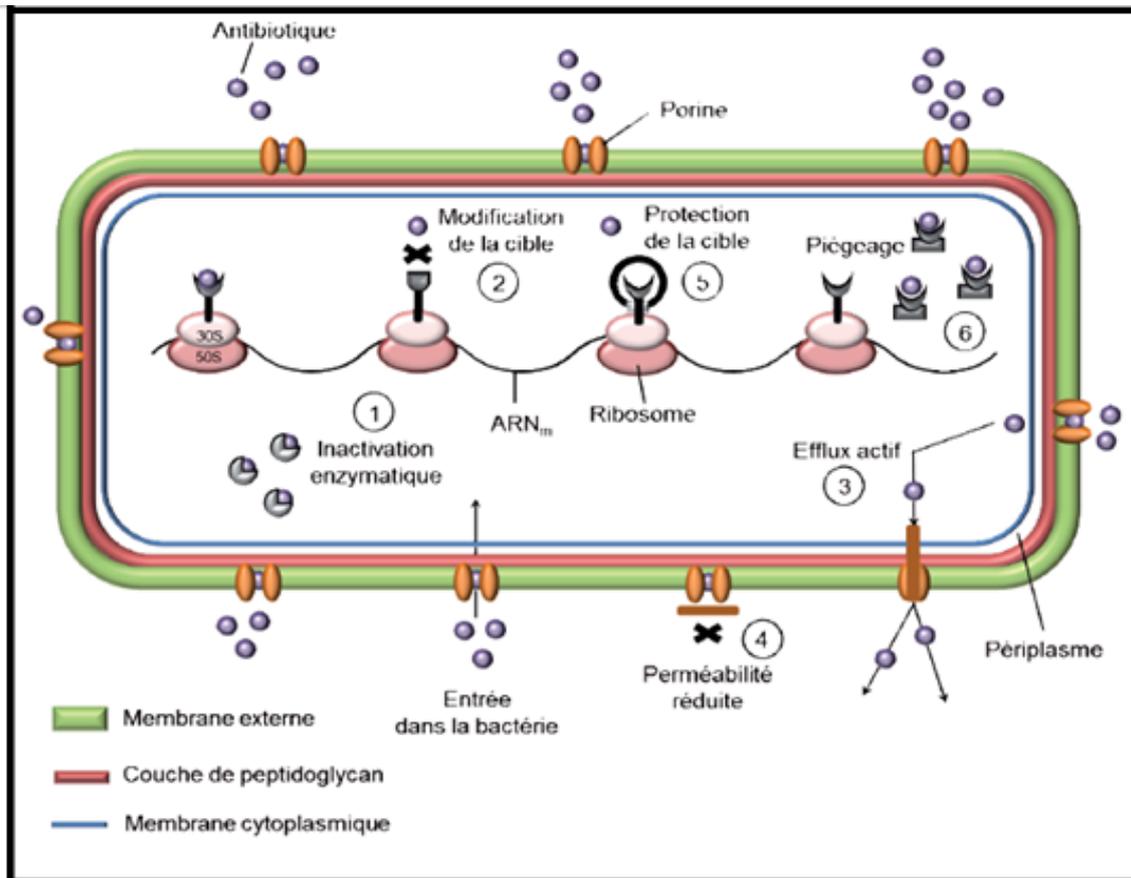
II-4-3-5- Protection de la cible de l'antibiotique

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Elle est due à des protéines qui confèrent une résistance en se fixant sur les cibles de ces enzymes, réduisent ainsi l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles (CAVACO *et al.*, 2009 ; WANG *et al.*, 2009).

II-4-3-6- Piégeage de l'antibiotique

Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte

une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006).



1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique.

Figure 13 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006)

II-4-4- Mécanismes de résistance chez *S. aureus*

II-4-4-1- Résistance aux β -lactamines

Selon CHAMBERS (2009), deux principaux mécanismes de résistance aux β -lactamines sont décrit chez *S. aureus* : la production de β -lactamase et la production de PLP modifiées (figure 14).

II-4-4-1-1- Production de β -lactamases

La pénicillinase est une protéine enzymatique capable d'hydrolyser le cycle β -lactame présent chez la pénicilline G et toutes les molécules dérivées (DONIO, 2010). De plus, il existe des inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) qui restaurent l'activité des antibiotiques qui leur sont associés (COURVALIN *et al.*, 2006). La pénicillinase staphylococcique est le produit d'expression du gène *blaZ*. Celui-ci, est porté

par un plasmide ou un transposon (LOWRY, 2003).

II-4-4-1-2- Modification de cible

Cette résistance est due à la production d'une PLP additionnelle, la PLP2a, qui se rajoute au PLP « normales » de *S. aureus*. En présence des β -lactamines les PLP sont inhibées, sauf la PLP2a. Cette protéine est codée par le gène *mecA*, qui est porté par un élément génétique mobile particulier, une cassette chromosomique appelé SCC*mec*, insérée dans un locus spécifique (LECLERQ et DAUREL, 2008).

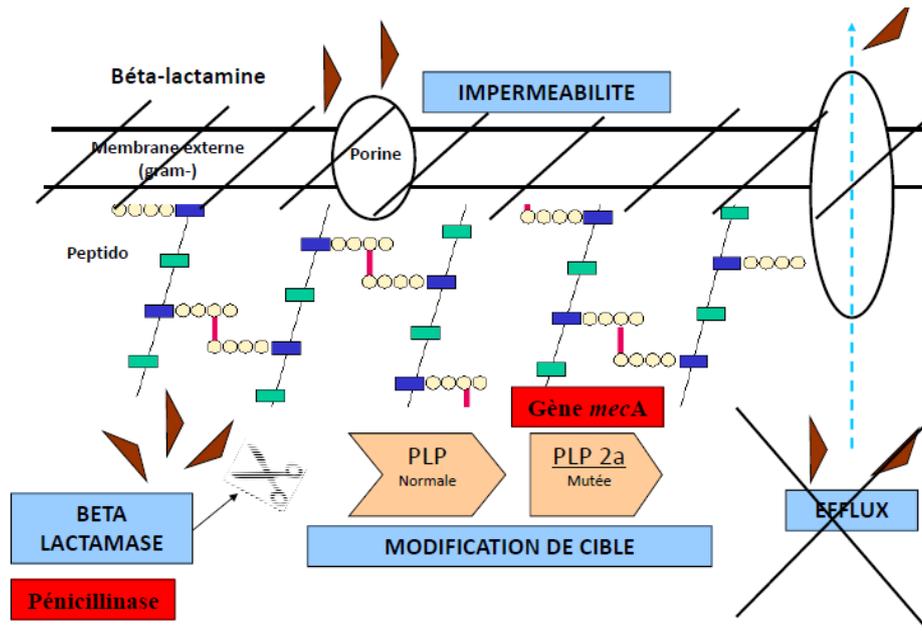


Figure 14: Résistance aux bêtalactamines chez les *Staphylocoque* (MAINARDI, 2015).

II-4-4-2- Résistance aux glycopeptides

Dans la famille des glycopeptides, l'antibiotique de référence utilisé pour le traitement des infections à SARM est la vancomycine (TANKOVIC *et al.*,1997). Cependant, il n'est utilisé qu'en dernier recours à cause de sa toxicité rénale (BAMGBOLA, 2016).

Deux types de résistances à la vancomycine ont été rapportés dans la littérature. La première est due à des mutations génétiques causant une baisse dans la production de PLP, additionnée à la production de couches supplémentaires de peptidoglycane. Ce mécanisme conduit à l'augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à 4-8 $\mu\text{g/ml}$, d'où le nom de *S. aureus* à résistance intermédiaire vis-à-vis de la vancomycine (VISA) (HIRAMATSU, 2001 ; SRINIVASAN *et al.*,2002).

Le second type de résistance vient de l'acquisition par *S. aureus* du transposon Tn 1546 par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine (GARDETE et TOMASZ, 2014). Ce transposon contient neuf gènes responsables de la synthèse d'un précurseur du peptidoglycane modifié, où le D-Ala-D-Ala est substitué par un D-Alanyl-D-Lactate (D-

Ala-D-Lac), qui a une très faible affinité vis-à-vis de la vancomycine (BONECA et CHIOSIS, 2003). Il en résulte des souches dont la CMI est supérieure à 128 µg/ml, qui sont dénommées : *S. aureus* résistant à la vancomycine (VRSA) (LOWY, 2003).

II-4-4-3- Résistance aux Tétracyclines

Deux mécanismes de résistance ont été rapportés chez *S. aureus* (figure 15). Le premier consiste à protéger le ribosome via des protéines codées par des gènes plasmidiques ou se trouvant dans des transposons (ROBERTS et SCHWARZ, 2009). Ces protéines (principalement TetM et TetO) se fixent sur le ribosome, induisant l'augmentation de la constante de dissociation du complexe ribosome-tétracycline. Cela a pour effet de relarguer la molécule antibiotique et de rendre le ribosome fonctionnel (SCHNAPPINGER et HILLEN, 1996 ; CONNELL *et al.*, 2003). Le deuxième mécanisme est dû à un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire codée par les gènes *tetK* et *tetL* qui sont d'origine plasmidique (COURVALIN et LECLERCQ, 2012). Cet efflux réduit la concentration de l'antibiotique dans le cytoplasme, protégeant ainsi les ribosomes (CHOPRA et ROBERTS, 2001).

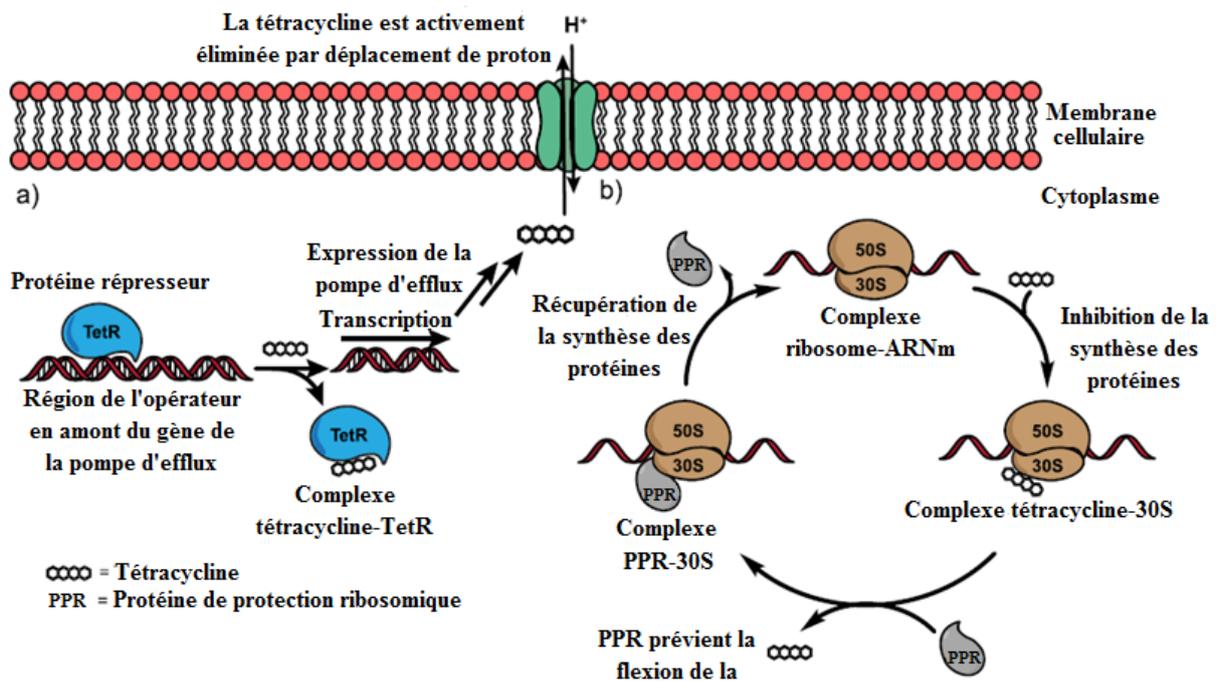


Figure 15 : Mécanismes courants de résistance à la tétracycline (HOBSON *et al.*, 2021).

II-4-4-4- Résistance aux Quinolones

Chez *S. aureus*, la résistance aux quinolones est due à deux mécanismes, dont le premier consiste en la modification de la cible, soit de la topo-isomérase IV par mutation des gènes chromosomiques *gla* ou *grib*, soit des sous unités de la gyrase impliquée dans la synthèse de l'ADN bactérien par mutation du gène *gyrA* ou *gyrB*. Le second mécanisme est un système

d'efflux actif grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène chromosomique *norA* (QUINCAMPOIX et MAINARDI, 2001).

II-4-4-5- Résistance aux Macrolides, Lincosamides, Streptogramine (MLS_B)

La modification de la cible des antibiotiques qui est le mécanisme le plus répandu et confère un spectre de résistance croisé entre macrolides, lincosamides et streptogramines B, d'où son nom de MLS_B (figure 16), car ces antibiotiques ont des sites de fixation communs. En effet, les souches résistantes produisent une enzyme, une méthylase d'origine plasmidique (codée par le gène *emr*), qui modifie la cible ribosomale par méthylation (CRISTINO, 1999). Cette résistance peut être inductible (induite en présence de macrolides) ou constitutive (exprimée en permanence) (LECLERCQ, 2002).

L'inactivation enzymatique, un autre mécanisme, est due à diverses enzymes spécifiques. Les lincosamides peuvent être inactivées par une acétylase codée par un gène plasmidique *linA* (LECLERCQ, 2002). Les streptogramines sont touchées par une hydrolase codée par le gène *vgb* et par la production d'acétylases codées par les gènes *vga* et *vat* (TANKOVIC *et al.*, 1997 ; DONIO, 2010) (figure 16).

Un mécanisme d'efflux ne touche que les antibiotiques de structure apparentée. L'Erythromycine ainsi que les autres macrolides peuvent subir un efflux actif grâce à une pompe ABC transporteur codée par le gène plasmidique *msrA*. Les ABC transporteurs sont ATP dépendants (LECLERCQ, 2002) (figure 16).

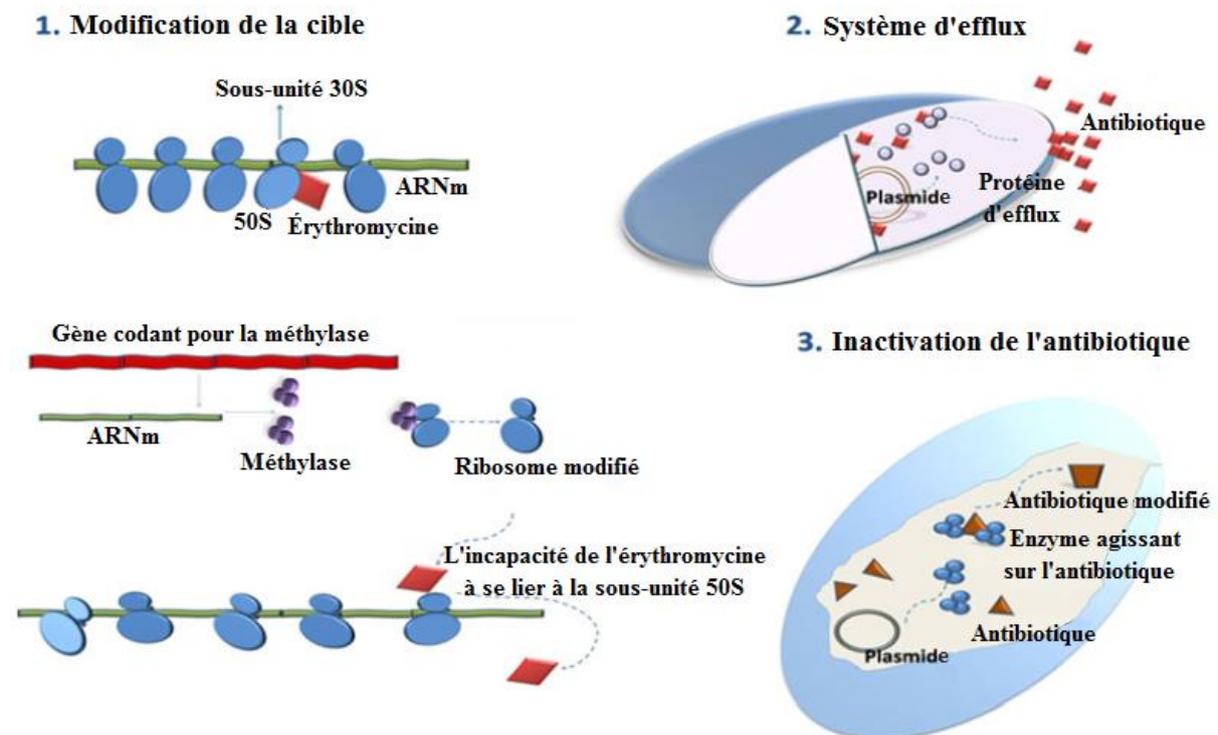


Figure 16 : Mécanismes de résistance bactérienne aux MLS_B (THUMU et HALAMI, 2012).

II-4-4-6- Résistance aux aminosides

Les staphylocoques sont normalement sensibles à tous les aminosides, Les aminosides sont surtout utilisés en association avec les β -lactamines ou les glycopeptides (BISMUTH et LECLERCQ, 2000).

Le principal mécanisme de résistance aux aminosides (kanamycine, amikacine, néomycine tobramycine, gentamicine) est lié à des modifications de la cible ribosomale par des enzymes codées par des gènes plasmidiques ou transposables (QUINCAMPOIX et MAINARDI, 2001; LECLERCQ, 2002). Chaque enzyme va modifier un certain nombre d'aminosides différents, ce qui va se traduire par un phénotype de résistance spécifique de l'enzyme (COURVALIN *et al.*, 2006).

Selon (DONIO, 2010), parmi les enzymes de résistances les plus fréquentes :

- Aminoglycoside phosphotransférase **APH 3'III**: inactive la néomycine, la kanamycine et partiellement l'amikacine (phénotype K).
- Aminoglycoside nucléotidyltransférase **AAD 4'-4''**: inactive la kanamycine, la tobramycine et partiellement l'amikacine par addition d'un groupement adényl (phénotype KT).
- Aminoglycoside acétyltransférase **AAC6'-APH2''**: est une enzyme bifonctionnelle (exerce une double activité nucléotidyltransférasique et phosphotransférasique) sur la tobramycine, la kanamycine et la gentamicine.

II-4-4-7- Résistance aux Phénicolés

La résistance de haut niveau au chloramphénicol chez *S. aureus* est due au gène *cat* localisé sur un plasmide. Ce gène code pour une chloramphénicol acétyltransférase qui neutralise l'antibiotique (KASTEN, 1999). Par ailleurs, les mécanismes d'efflux multiples comme *norA* peuvent entraîner une augmentation des CMI des phénicolés vis-à-vis de *S. aureus* (DONIO, 2010).

Chapitre III

Formation de biofilm

III- Formation de biofilm

III-1- Historique

La découverte des biofilms microbiens est attribuée à l'inventeur du microscope (ROUX et CHIGO, 2006). Antoni Van Leeuwenhoek, considéré comme l'un des fondateurs de la microscopie, fut le premier à observer des microorganismes issus de grattages de sa propre surface dentaire dans les années 1680 (ROUX et GHIGO, 2006).

En 1932, Henerici observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames lors de l'expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames en verre placées dans un aquarium. Il a délivré l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (TRAUTNER *et al.*, 2009).

L'existence de l'état sessile avec l'état planctonique a été reconnue suite à la découverte faite par Zobell en 1943, montrant que le nombre de bactéries colonisant les parois d'une bouteille remplie d'eau de mer était supérieur à celui des bactéries dans l'eau (DONLAN, 2002).

Dans les années 1980, Costerton et ses collaborateurs ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes, ils ont proposé pour la première fois la théorie de « biofilm », qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent aux surfaces biotiques ou abiotiques et les avantages accumulés par cette niche écologique (CHALVET de ROCHEMONTEIX, 2009 ; KARA, 2014).

Cette période a été également marquée par la découverte des biofilms sur les dispositifs médicaux. Dès lors et à ce jour, de nombreux travaux ont montré que les surfaces des dispositifs médicaux sont favorables à la colonisation microbienne et au développement de biofilms (HAZAN *et al.*, 2006 ; BRUELLHOFF *et al.*, 2010 ; TRETER et MACEDO, 2011 ; DJERIBI *et al.*, 2012).

Les techniques de microscopie de haute résolution (microscopie électronique à balayage, microscopie confocale à balayage laser, la microscopie de force atomique) utilisées souvent en combinaison ont permis d'observer des biofilms intacts, révélant leur structure et architecture tridimensionnelle (HEYDORN *et al.*, 2000 ; TOMAS *et al.*, 2010) et de réaliser de grands progrès dans la connaissance et la compréhension du phénomène (DIGE *et al.*, 2007; SCHAUDINN *et al.*, 2009 ; NEU *et al.*, 2010).

III-2- Définition

Un biofilm peut être défini comme un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes (BEHLOU et GILMORE, 2008), qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de microcolonies

associées entre elles et à des surfaces biotiques ou abiotiques qui peuvent prendre plusieurs formes : minérales (roche, interface air-liquide...), organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surface alimentaires ou coques des navires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) (BRANGER *et al.*, 2007 ; BELLIFA, 2014). C'est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif (BOUTALEB, 2007 ; SALAUN, 2009).

III-3- Composition du 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 (BELLIFA, 2014).

III-3-1- 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. C'est le cas de biofilms naturels, qui 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).

III-3-2- La matrice

Elle est hautement hydratée dont l'eau peut représenter jusqu'à 97% du poids humide d'un biofilm (ROUX et GHIGO, 2006). Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations (FLEMMING et WINGENDER, 2010) (figure 17). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (YANNICK *et al.*, 2014).

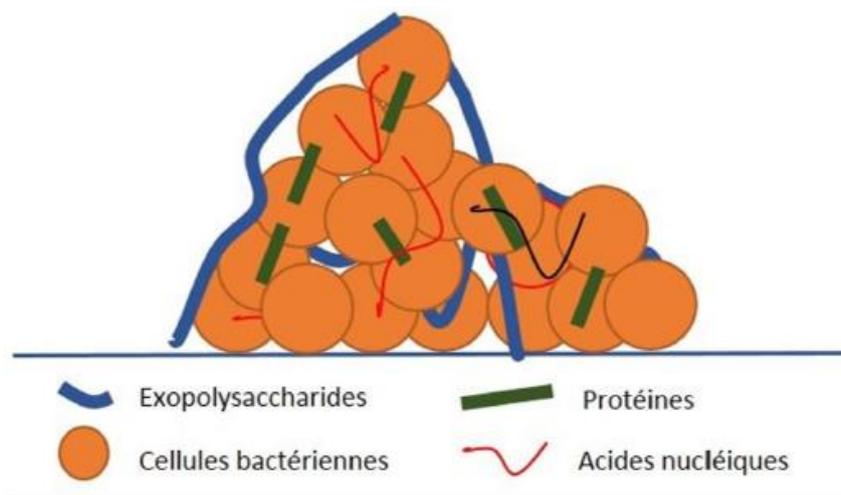


Figure 17: Composition du biofilm (LISTER et HORSWILL, 2014).

III-4- Formation de biofilms chez *S. aureus*

Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent (HARAS, 2005). On différencie en général cinq phases : développement d'un film conditionnant sur une surface, mouvement des bactéries planctonique vers cette surface, adhésion réversible puis irréversible des microorganismes à la surface, croissance et division des microorganismes puis formation de microcolonies et maturation du biofilm et finalement le détachement et dispersion de cellules du biofilm (figure 18) (PERCIVAL *et al.*, 2011).

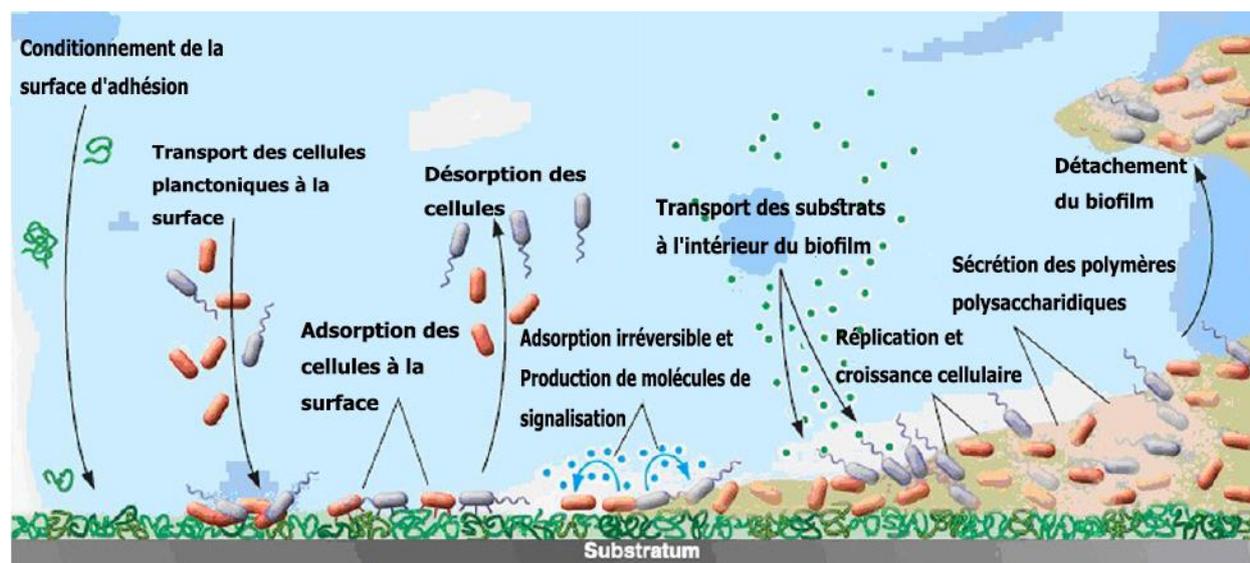


Figure 18 : Processus régissant la formation du biofilm (BREYERS et RATNER, 2004).

III-4-1- Conditionnement de la surface

La surface de tout support exposée à un milieu aqueux sera inévitablement et presque immédiatement conditionnée ou recouverte de polymères provenant de ce milieu (DONLAN, 2002). L'adsorption de ces molécules conduit à une modification des propriétés physico-chimiques de la surface d'origine (rugosité, polarité, caractère hydrophile/hydrophobe), ce qui a pour conséquence de favoriser ou d'inhiber l'adhésion bactérienne (STOODLEY *et al.*, 2002 ; LORITE *et al.*, 2011). De plus, l'adsorption et l'accumulation de molécules organiques sur le support permettent une disponibilité en nutriments favorisant le chimiotaxisme et l'installation des microorganismes sur la surface (KUMAR et ANAND, 1998 ; GARRETT *et al.*, 2008).

Selon l'environnement, il a été démontré que le film de conditionnement est constitué de polysaccharides, de glycoprotéines et de composés humiques. Chez l'hôte humain, le film de conditionnement est déterminé par le site à conditionner (GABI *et al.*, 2011).

III-4-2- Transport des bactéries vers le support

Les interactions entre les bactéries et le support nécessitent un rapprochement d'environ 50

nm tel qu'il est exprimé dans les théories de l'adhésion (KATSIKOIANNI et MISSIRLIS, 2004 ; HORI et MATSUMOTO, 2010). Pour cela, les bactéries doivent être transportées à proximité du support par un mécanisme actif ou passif. Le transport actif consiste dans le déplacement des cellules en réponse à l'attraction exercée par la couche visqueuse riche en nutriments (chimiotactisme), ce phénomène implique les organites de déplacement tels que les flagelles, mais également des récepteurs spécifiques et sensibles aux variations de concentrations des nutriments présents (O'MAY et TUFENKJI, 2007 ; HOURY *et al.*, 2010). Le transport passif, dépend plus du milieu dans lequel les bactéries évoluent (viscosité du milieu, force ionique), ainsi que le mouvement de ce dernier (écoulement, sédimentation flux brownien) (HORI et MATSUMOTO, 2010).

III-4-3- l'Adhésion

L'adhésion à une surface inerte ou vivante est un processus complexe, qui est caractérisé par une phase physicochimique initiale non spécifique (adhésion réversible), suivie par une phase moléculaire et cellulaire spécifique appelée l'adhésion irréversible (STREVETT et CHEN, 2003 ; CHEN *et al.*, 2011). L'attachement de *S. aureus* aux surfaces abiotiques comme le verre, les métaux et les plastiques peut être non spécifique. L'attachement aux surfaces biotiques dépend du MSCRAMM bactériens (FOSTER *et al.*, 2014). L'adhésion de la cellule au cours de la phase réversible dépend fortement des propriétés physicochimiques de la surface de la cellule bactérienne (FERREIRA *et al.*, 2010), mais également des propriétés physicochimiques de la surface telles que la texture (rugueuse ou lisse), la charge de surface, l'hydrophobie (ABDALLAH *et al.*, 2009 ; NILSSON *et al.*, 2011).

Elle est dominée par des interactions de longues distances, considérées comme de faible intensité. Il s'agit des forces d'attractions de Van der Waals et des interactions électrostatiques répulsives qui apparaissent lorsque la distance qui sépare les bactéries du support atteint 50 nm (KARATAN et WATNICK, 2009).

En phase d'adhésion irréversible, l'encrage des bactéries se met en place sur de courtes distances (1 à 1,5 nm) (GARRETT *et al.*, 2008 ; PERCIVAL *et al.*, 2011). L'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support (SPIERS *et al.*, 2003 ; KUCHMA *et al.*, 2005). Dans ce cas, des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe (BRANGER *et al.*, 2007), et surtout grâce à des structures d'adhésion qui varient selon les types de microorganismes concernés (BELOIN et al., 2005). Chez les bactéries Gram positifs, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix (VAN HOUTT et MICHIELS, 2005).

III-4-4- Croissance et maturation du biofilm

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, un processus appelé maturation consolide la transition de la vie bactérienne planctonique à la vie bactérienne sessile. Au cours de cette étape, la majeure partie de l'EPS est formée, favorisant l'adhésion intercellulaire et permettant aux cellules de s'accumuler en plusieurs couches pour former une communauté tridimensionnelle (KRANJEC *et al.*, 2021).

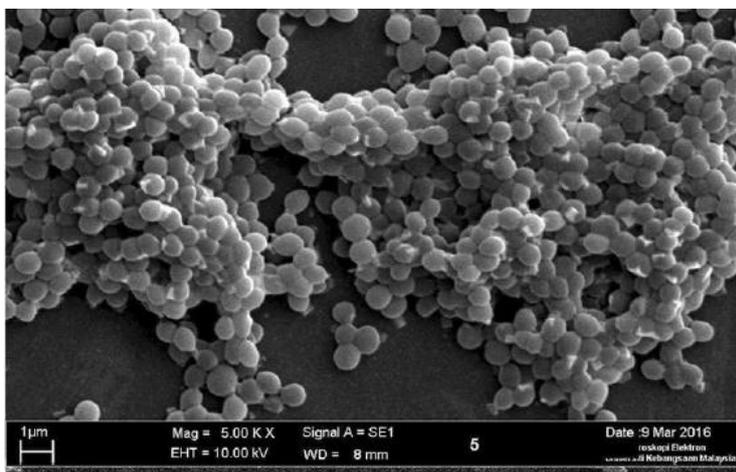


Figure 19: Micrographie en microscopie électronique à balayage de la structure du biofilm de *S. aureus* (KONG *et al.*, 2018).

Le Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) est considéré comme le principal composant des biofilms staphylococciques (MACK *et al.*, 1996). En 2001, Cucarella et ses collaborateurs ont rapporté la formation d'un biofilm par une souche de *S. aureus* d'origine animale sans PIA (CUCARELLA *et al.*, 2001). Ils ont mis en évidence que les étapes d'accumulations se faisaient via un autre mécanisme impliquant la protéine de surface Bap (biofilm associated protein). Par la suite, d'autres protéines responsables de l'accumulation bactérienne dans les biofilms ont été décrites chez les staphylocoques, notamment les FnBPs chez des souches de SARM, ou la protéine SdrC chez *S. aureus* (ROHDE *et al.*, 2005 ; FEUILLIE *et al.*, 2017). Dans le cadre d'une infection humaine, Zapotoczna et ses collaborateurs ont également mis en évidence l'utilisation de protéines de l'hôte par la bactérie dans les étapes de maturation du biofilm (ZAPOTOCZNA *et al.*, 2015). En effet, via la production de coagulase, la prothrombine de l'hôte est détournée pour former un complexe transformant le fibrinogène en fibrine qui est par la suite intégrée par les staphylocoques pour former leur matrice (VANASSCHE *et al.*, 2013 ; KOBAYASHI *et al.*, 2015). La présence de fibres amyloïdes a récemment été décrite dans les biofilms staphylococciques matures (MARINELLI *et al.*, 2016). Ces fibres proviennent des phenol-soluble modulins (PSM). En 2016, Taglialegna et ses collaborateurs ont également observé ce phénomène avec la protéine Bap (TAGLIALEGNA *et al.*, 2016).

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (FOLKESSON *et al.*, 2008), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments ainsi que l'élimination des déchets (TENKE *et al.*, 2006).

La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (JACOBSEN *et al.*, 2008).

Les staphylocoques possèdent donc plusieurs mécanismes pour l'étape de maturation. Ces mécanismes sont dépendants d'une part, des souches, et d'autre part des conditions environnementales, et conduisent à la formation de différents types de biofilms (figure 20) (ZAPOTOCZNA *et al.*, 2016).

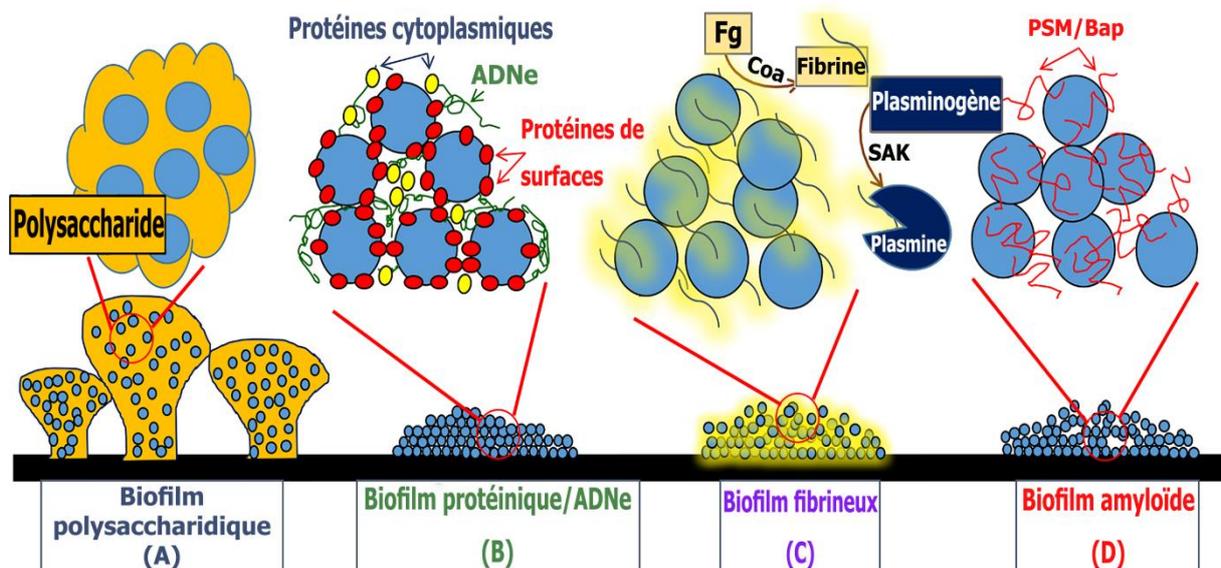


Figure 20 : Représentation des différents types de biofilms staphylococciques (ZAPOTOCZNA *et al.*, 2016).

III-4-5- Dispersion/ détachement du biofilm

Elle est également appelée phase planctonique, puisque des cellules différenciées quittent le biofilm et retournent à l'état libre perdant ainsi le phénotype biofilm (DONLAN, 2002 ; MCDOUGALD *et al.*, 2012), mais ont la capacité de coloniser de nouvelles surfaces et d'initier un nouveau biofilm (YANNICK *et al.*, 2014). La dispersion de ces microorganismes peut être passive et/ou active, le détachement passif implique le milieu environnant et les forces que ce dernier peut appliquer sur le biofilm provoquant la dispersion des microorganismes (STOODLEY *et al.*, 2002), tels que la perturbation mécanique (forces de cisaillement) (JACQUES *et al.*, 2010), les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement (HARAS, 2005 ; PAROT, 2007).

Le détachement actif est un phénomène hautement régulé comprenant plusieurs circuits

sensoriels (KARATAN et WATNICK, 2009). Sous l'action du *quorum sensing*, des populations bactériennes vont exprimer, surexprimer ou réprimer des gènes facilitant la dispersion (STOODLEY *et al.*, 2002), tels que le contrôle du production PSM (Phenol-soluble modulins) dans les biofilms staphylococcique (PESCHEL et OTTO, 2013). Ces petits peptides amphiphiles possèdent des propriétés surfactantes responsables du décrochage des biofilms dont huit PSM ont été décrit chez *S. aureus* (PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3, PSM α 4, PSM β 1, PSM β 2, et δ -toxine) (WANG *et al.*, 2007). Les bactéries vont ainsi produire des agents (protéases et nucléases) leur permettant de consommer la matrice extracellulaire qui les entourent afin de se procurer une source d'énergie et se séparer du biofilm (STOODLEY *et al.*, 2002 ; KAPLAN *et al.*, 2004). *S. aureus* possède deux nucléases sécrétées appelées *nuc1* et *nuc2* (KIEDROWSKI *et al.*, 2011 ; KIEDROWSKI *et al.*, 2014). Des protéases extracellulaires telles que SplABCDE (BOLES *et al.*, 2008), SspA (V8) sérine protéase (MOOTZ *et al.*, 2013) et auréolysine (Aur) (BOLES *et al.*, 2008 ; ABRAHAM *et al.*, 2012) ont été associées au détachement de biofilms staphylococcique (KRANJEC *et al.*, 2021).

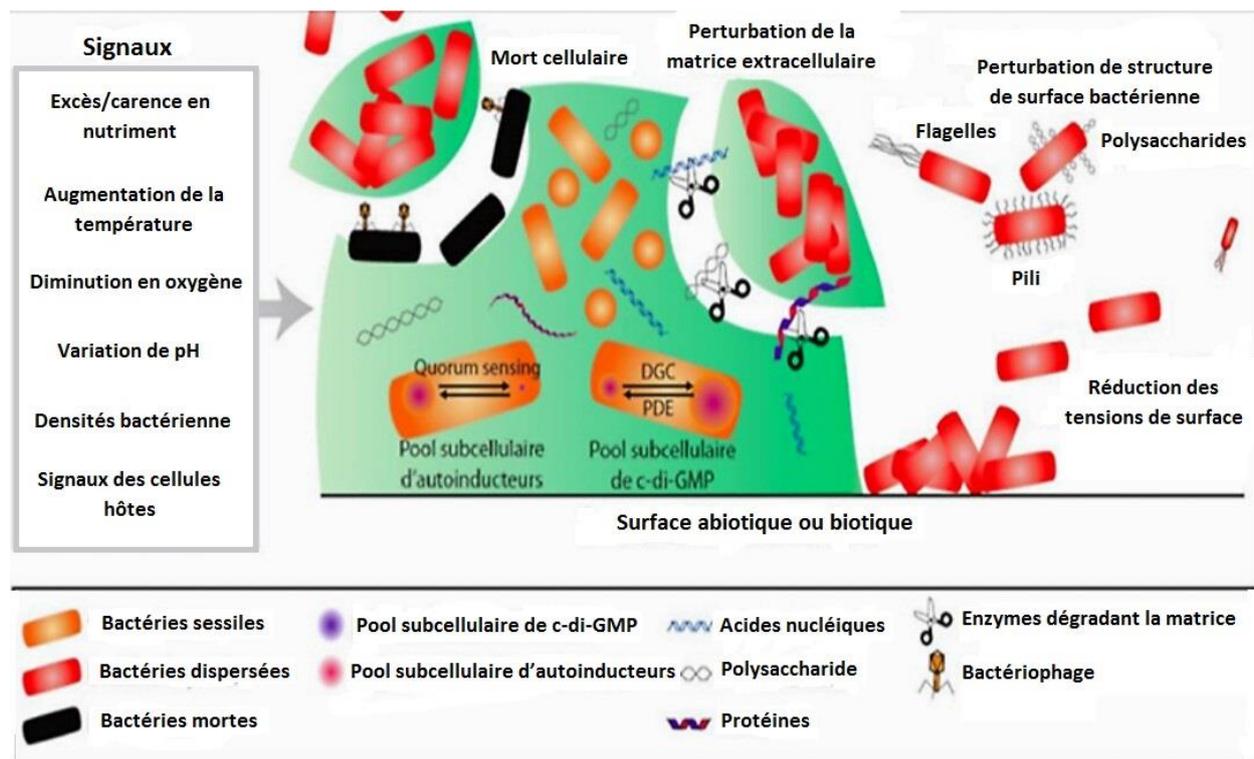


Figure 21 : Dispersion d'un biofilm mature (AUMERAN *et al.*, 2020).

III-5- Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation de biofilm est un processus bien organisé, qui dépend du film de conditionnement, des caractéristiques du milieu et des propriétés de la cellule microbienne (MARTINEZ *et al.*, 2007).

III-5-1- Caractéristiques de la surface

Les bactéries adhèrent aux surfaces biotiques ou abiotiques afin de les coloniser (ROBLERO *et al.*, 2016). En général, les propriétés de surface telles que la composition chimique du matériau, l'énergie libre de surface, la charge, l'hydrophobicité, la rugosité et la porosité (TRETER et MACEDO, 2011) influencent l'attachement des bactéries à cette surface et par conséquent la formation d'un biofilm (KLEIN, 2011 ; BELLIFA, 2014).

III-5-2- Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clés (MARTINEZ, 2007 ; GOLLER et ROMEO, 2008), comprenant les conditions environnementales telles que la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, hydrodynamique du fluide, la concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques, les sources de carbone disponibles...etc) (HAMADI *et al.*, 2004 ; MARTINEZ et CASADEVALL, 2007 ; DUMAS, 2007 ; MARCHAL, 2010).

III-5-3- Caractéristiques des microorganismes

Pour une surface de matériau donnée, différentes espèces et souches bactériennes adhèrent différemment puisque les différentes espèces et souches ont des caractéristiques physicochimiques différentes (KATSIKOIANNI et MISSIRLIS, 2004).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes, cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries sur une surface, moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (LIESSE, 2012 ; BELLIFA, 2014). Cette association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule...) (PERRIN, 2009).

III-6- Avantages et conséquences du mode de vie en biofilm

III-6-1- Coopérations métaboliques et échanges d'informations au sein du biofilm

III-6-1-1- Coopération métabolique

Des études montrent que la formation des biofilms dépend de l'accessibilité des bactéries aux nutriments car dans des conditions pauvres en nutriments, les bactéries seraient sous forme planctonique afin de se diriger vers des environnements plus favorables (STANLEY et LAZAZZERA, 2004). Par ailleurs, les biofilms sont généralement constitués de plusieurs espèces de bactéries dont la proximité dans le biofilm facilite les échanges et la mise en place de symbioses entre des bactéries aux besoins métaboliques différents (SHAPIRO, 1998).

III-6-1-2- Signalisation au sein du biofilm

La densité des bactéries et leurs contacts cellulaires facilitent la communication intercellulaire via un mécanisme appelé *Quorum sensing* (AHMER, 2004), une communication chimique implique la sécrétion, la détection et la réponse à de petites molécules semblables à des hormones appelées auto-inducteurs (AI) (CHRISTOPHER et BASSLER, 2007).

Chez les bactéries à Gram négatif, l'auto-inducteur est un dérivé N-acylhomosérine lactone (NASSER et REVERCHON, 2007 ; SEGHIR *et al.*, 2016), alors que chez les bactéries à Gram positif, ce sont des polypeptides (WATERS et BASSLER, 2005 ; ABRAHAM, 2006). Un troisième mécanisme appelé le AI-2 est proposé comme étant un système de signalisation commun à toutes les bactéries (WINANS et BASSLER, 2002 ; WATERS et BASSLER, 2005).

Le *Quorum sensing* est impliqué dans la régulation des différentes étapes du développement du biofilm. Cette stratégie de communication empêche la surpopulation inutile et contrôle la compétition pour les nutriments, en plus des implications dans le processus infectieux, en particulier pour la diffusion et la création de nouveaux sites d'infection (HORNBY *et al.*, 2001). Il peut aussi réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (IRIE et PARSEK, 2008).

III-6-2- Transfert d'information génétique au sein du biofilm

Les transferts horizontaux d'information génétique jouent un rôle important dans l'évolution et la diversité génétique des communautés microbiennes. L'un des principaux mécanismes de transfert génétique est celui de la conjugaison qui permet l'échange direct d'ADN par contact physique entre deux cellules via un pilus de conjugaison (BJORKLOF *et al.*, 2000 ; GHIGO, 2001).

III-6-3- Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement

La nature particulière de l'architecture du biofilm et les attributs physiologiques des micro-organismes situés dans le biofilm confèrent une forte résistance à diverses agressions extérieures comme les UV, les changements de pH et d'osmolarité, la prédation et les agents antimicrobiens (CERI *et al.*, 1999 ; DRAGO et TOSCANO, 2017).

La diminution de la sensibilité aux antibiotiques n'est pas liée à un seul mécanisme de résistance (ROSS, 2010). Trois hypothèses principales sont avancées afin d'expliquer les mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques (figure 22) (STEWART et COSTERTON, 2001). La première repose sur le fait que la matrice polymérique agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens (YANNICK *et al.*, 2014). La seconde hypothèse est liée à l'environnement spécifique du biofilm, dont les zones les

plus profondes, riches en résidus acides, pauvres en oxygène et en nutriments, pourraient gêner l'action de l'antibiotique (STEWART et COSTERTON, 2001). Enfin, la dernière hypothèse s'appuie sur la modification des propriétés physiologiques des microorganismes en induisant des mécanismes de résistance connus et cela est dû à la structure du biofilm qui facilitent le transfert horizontal de gènes entre les bactéries, processus impliqué dans l'acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques (ROUX et GHIGO, 2006).

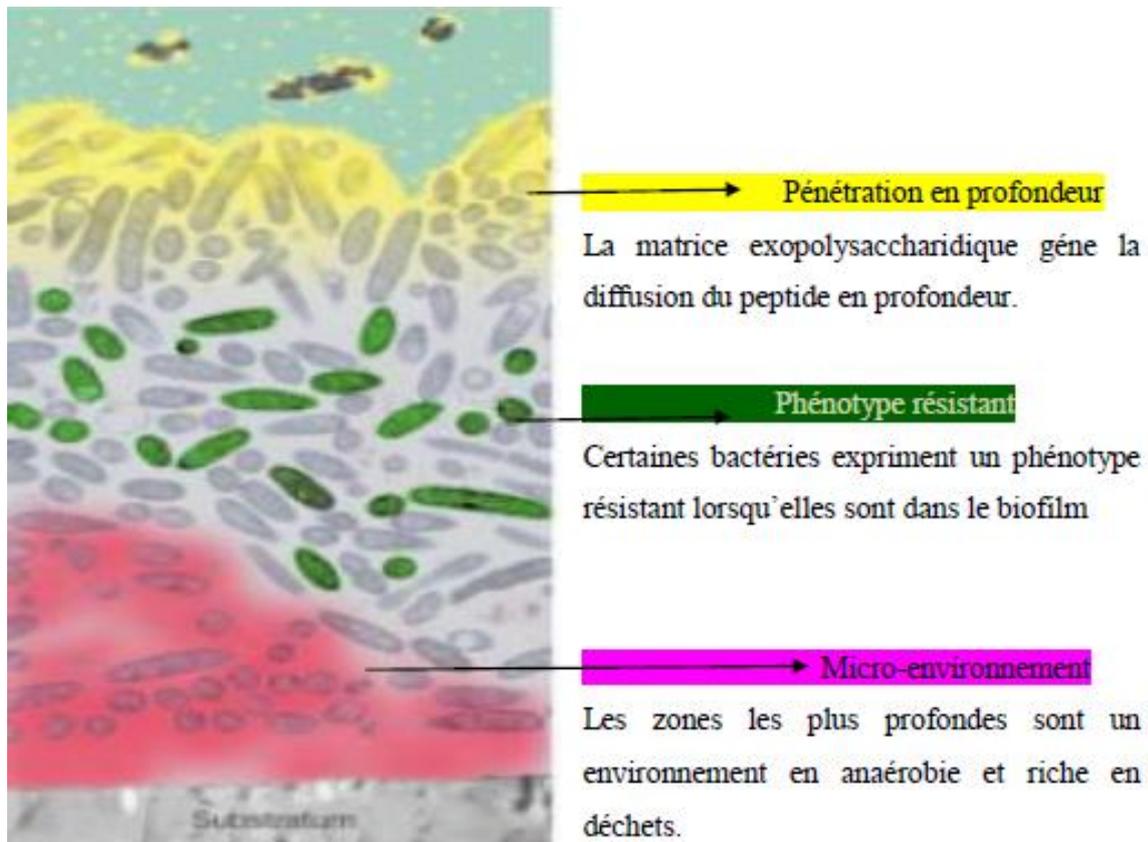


Figure 22 : Mécanismes de résistance du biofilm aux antibiotiques (STEWART, 1996).

III-7- Effets bénéfiques et néfastes de biofilms

III-7-1- Effets bénéfiques

Les biofilms jouent un rôle positif pour notre santé, ils assurent un rôle de protection et participent au processus de digestion (MACFARLANE et DILLON, 2007). Ils jouent aussi un rôle clé dans la production et la dégradation de la matière organique, dans les cycles d'azote, de soufre, ainsi dans la dégradation des polluants (MARCHAL, 2010). Les biofilms peuvent se révéler très utiles dans le domaine agroalimentaire. La production d'éthanol dans des réacteurs dans lesquels des levures sont immobilisées sous forme de biofilms, sont utilisés également dans la production du vinaigre (acide acétique) (ALNNASOURI, 2010) Les réacteurs à biofilm ont également été utilisés dans la production d'antibiotiques (ALNNASOURI, 2010). Ainsi, les

biofilms sont employés pour traiter les eaux usées et les décharges, pour dépolluer des sites contaminés et enfin, pour mobiliser les métaux lourds d'un sol ou d'un déchet par le procédé de biolixiviation (ROUX et GHIGO, 2006).

III-7-2- Effets néfastes des biofilms

Une estimation a révélé que 80% des infections dans le corps humain sont dues à de microbes impliqués dans la formation de biofilms (HØIBY, 2017). Il peut provoquer des infections courantes jusqu'à des infections dangereuses, telles que la fibrose kystique (KAPLAN, 2010).

Les biofilms peuvent poser un problème dans de nombreuses industries, dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable. La formation de biofilms dans les canalisations d'eau potable est également un problème majeur car l'ajout de chlore ne permet pas d'éliminer les bactéries fixées (COESTER et CLOETE, 2005). La formation des biofilms sur les métaux peut également engendrer des problèmes de corrosion susceptibles d'endommager, d'obturer et de contaminer durablement les systèmes de circulation de fluides. Dans l'industrie agro-alimentaire, les biofilms constitués d'organismes pathogènes représentent un problème sanitaire sérieux (ROUX et GHIGO, 2006).

III-8- Biofilm de *Staphylococcus aureus* dans l'industrie alimentaire

La formation de biofilm pose des problèmes dans plusieurs filières de l'industrie alimentaire (POULSEN, 1999). *S. aureus* est capable de former des biofilms sur diverses surfaces : sur des surfaces dures (équipements de l'industrie agroalimentaire, surfaces de transport, de distribution et de stockage, sol, etc.) ou sur des structures biologiques (légumes, viande, os, fruits, etc.) (FLEMMING *et al.*, 2016). Des altérations des propriétés du substrat et des facteurs environnementaux tels que l'osmolarité, la teneur en éléments nutritifs et la température peuvent entraîner le développement d'un biofilm staphylococcique (RODE *et al.*, 2007 ; PAGEDAR *et al.*, 2010 ; XU *et al.*, 2010 ; VAZQUEZ-SANCHEZ *et al.*, 2013).

Comme *S. aureus* est un composant majeur du microbiome humain, un degré élevé de manipulation peut favoriser la propagation de *S. aureus* aux aliments et aux surfaces en contact avec les aliments (DEVITA *et al.*, 2008 ; SOSPEDRA *et al.*, 2012). Une fois sur place, la formation de biofilms augmente la résistance de *S. aureus* aux stress agroalimentaires, tels que les agents antimicrobiens, les températures relativement élevées, les teneurs en sel élevées (VAN-HOUDT et MICHIELS, 2010 ; BRIDIER *et al.*, 2011; VAZQUEZ-SANCHEZ *et al.*, 2013).

III-9- Biofilms dans le secteur médical

La plupart des infections peuvent être traitées efficacement avec des antibiotiques, cependant

il y a deux exceptions importantes : les bactéries résistantes et les bactéries qui résident dans un biofilm qui peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes au traitement d'antibiotique que les mêmes organismes planctoniques (DAVEY *et al.*, 2000). La préoccupation principale des hôpitaux en regard des biofilms est directement liée à leur implication dans diverses pathologies infectieuses (HARRIOTT et NOVERR, 2011).

Le spectre des infections associées aux biofilms s'est profondément diversifié en intégrant des infections liées à des dispositifs médicaux implantés (prothèses articulaires, valve prothétique, cathéters urinaire, cathéters vasculaires) (figure 23), mais également des infections chroniques au cours desquelles les biofilms sont présents à la surface de tissus humains (LEBEAUX *et al.*, 2016).

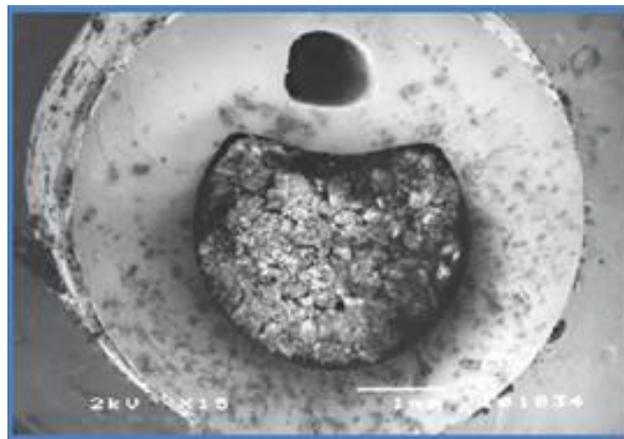


Figure 23 : Une coupe transversale d'une sonde urinaire en silicone à demeure. L'image montre l'incrustation de la sonde par un biofilm (STICKLER, 2008).

III-10- Détection de la production de biofilms

Diverses méthodes phénotypiques et génotypiques sont disponibles pour la détection de la formation de biofilm (MATHUR *et al.*, 2006 ; OLIVEIRA et CUNHA MDE, 2010).

III-10-1- Méthodes phénotypiques

III-10-1-1- Observation indirecte

III-10-1-1-1- La microplaques de titration

La technique de microplaques de titration au cristal violet, mise au point par O'Toole et Kolter en 1998 est une technique très utilisée pour l'étude de la formation de biofilms (NIU et Gilbert, 2004 ; PIERCE *et al.*, 2008). Les biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques à 96 puits (MATHUR *et al.*, 2006). Elle est basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm (NIU et GILBERT, 2004), permettant de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet (PRATT et KOLTER, 1998) (figure 24).

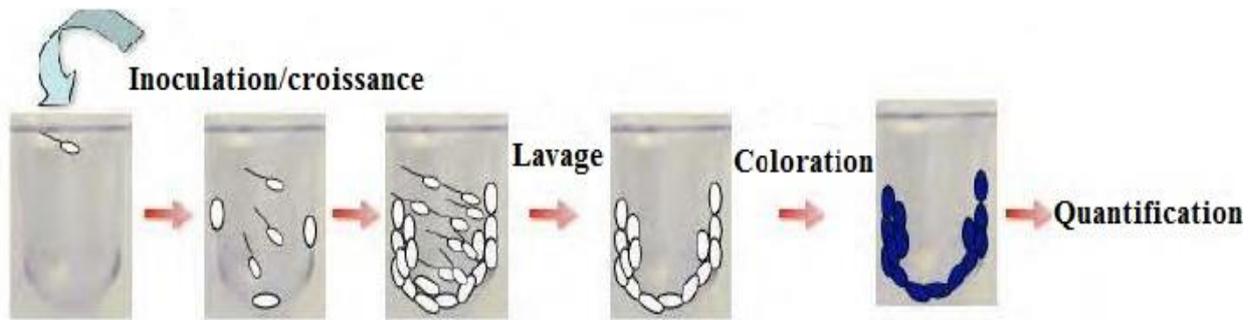


Figure 24 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques (BELLIFA, 2014).

III-10-1-1-2- Méthode du tube

La méthode du tube est un test qualitatif pour la détection d'un microorganisme producteur de biofilm, en raison de l'apparition d'un film visible dans un tube à essai en polystyrène suite à une coloration à la safranine (KIRMUSAOGLU, 2019), la formation de biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible tapisse la paroi et le fond du tube, la formation d'anneaux à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation de biofilm (figure 25) (RAKSHA *et al.*, 2020).



Figure 25 : Méthode des tubes. Les deux premiers tubes à essai en polystyrène à partir de la gauche indiquent la production de biofilm, les autres tubes à essai indiquent un manque de production de biofilm (KIRMUSAOGLU, 2019).

III-10-1-1-3- Culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

Freeman et ces collaborateurs ont décrit un test qualitatif pour détecter les microorganismes capables de produire un biofilm (ASGHARI *et al.*, 2021), à la suite du changement de couleur des colonies inoculées sur le milieu RCA (KIRMUSAOGLU, 2019). Le rouge congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens (PIA) formant un slime et donnant des colonies noires sur milieu RCA, contrairement aux colonies non productrices qui restent rouge (figure 26) (REWATKAR et WADHER, 2013 ; KARA TERKI, 2014) (figure 26).

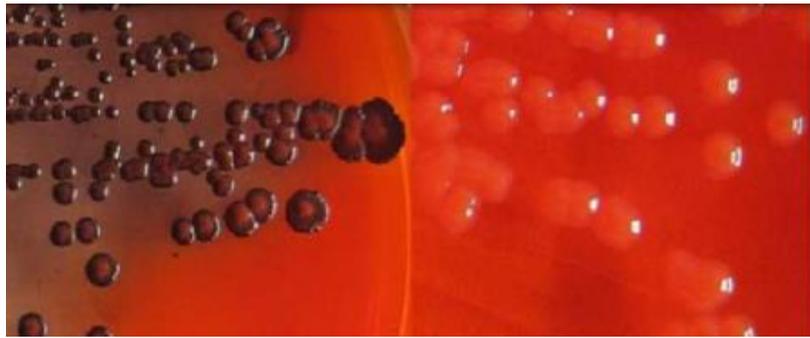


Figure 26 : Culture sur la gélose Rouge Congo (HOU *et al.*, 2012).

A gauche RCA-positive (colonies noires), à droite RCA-négative (colonies rouges).

III-10-1-1-4- Biofilm Ring Test (BRT)

Une nouvelle technique de détection et d'évaluation quantitative des biofilms décrite par Chavant et ses collaborateurs en 2007 (LIESSE IYAMBA, 2012 ; NAGANT, 2013), et développé par la Société Biofilm Control (PERRIN, 2009), permettant de mesurer les étapes initiales de formation du biofilm sans rinçage ni coloration (DI DOMENICO *et al.*, 2016). La technique repose sur l'utilisation de microbilles magnétisables ajoutées au milieu de culture qui, après incubation, vont être soumises à l'action d'un aimant. Les billes libres dans le milieu vont alors converger vers le centre du puits, générant un spot marron/rouge visible à l'œil nu. A l'inverse, si un biofilm s'est formé au fond du puits, les billes piégées par les bactéries adhérentes et la matrice sont immobilisées, conduisant à l'absence de spot après aimantation (HUANG *et al.*, 2008) (figure 27).

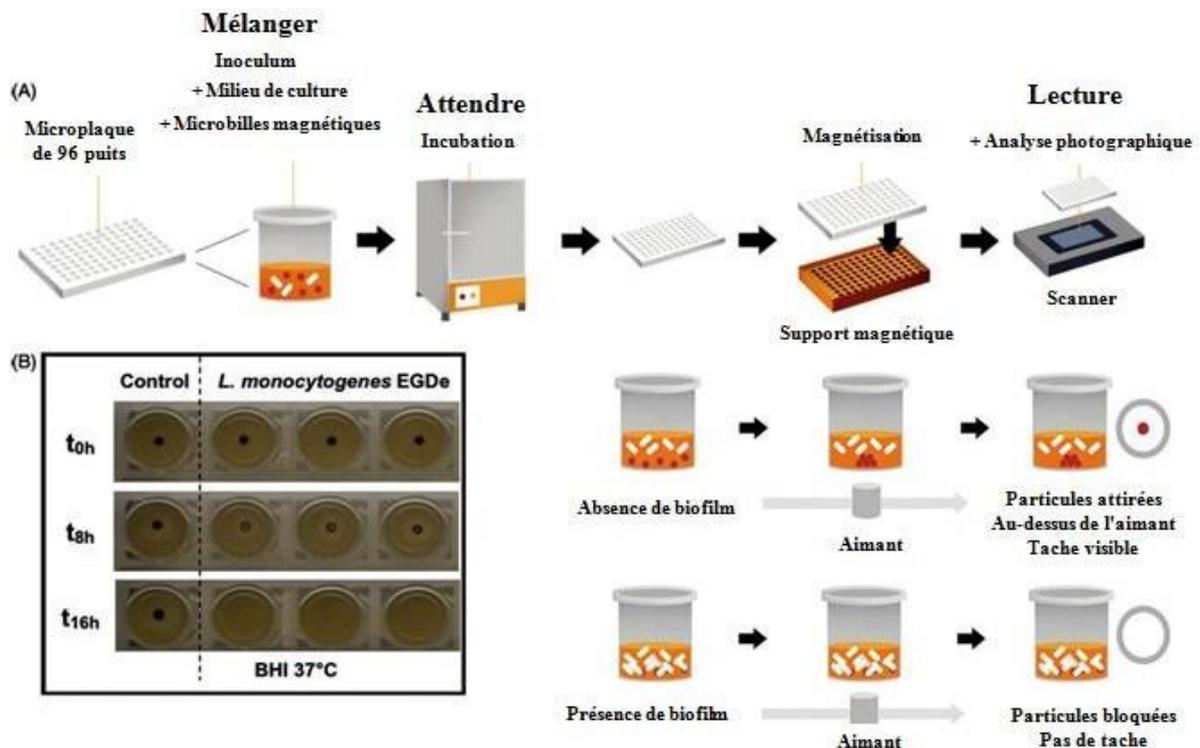


Figure 27 : Le protocole du Biofilm Ring Test (AZEREDO *et al.*, 2016).

III-10-1-2- Observation directe

III-10-1-2-1- Microscopie optique

La microscopie optique est la méthode la plus simple, la moins chère, la plus pratique et la plus rapide pour observer quantitativement la morphologie des micro-organismes adhérant aux surfaces et pour estimer semi-quantitativement la quantité de microorganismes attachés à la surface (KIRMUSAOGLU, 2019). Il a été constaté que l'absorption de la lumière par les biofilms était en corrélation avec la masse cellulaire du biofilm et la masse totale du biofilm. La microscopie optique est basée sur la relation linéaire entre l'intensité d'un pixel dans les images de biofilm et le nombre correspondant de cellules. Cette relation permet le calcul de l'épaisseur du biofilm (DE CARVALHO et DA FONSECA, 2007). Des colorants peuvent être utilisés parmi lesquels l'hématoxyline et l'éosine, l'acide périodique de Schiff ou la coloration de Gram de Brown and Brenn (AKIYAMA *et al.*, 2003 ; DAVIS *et al.*, 2008).

III-10-1-2-2- Microscope électronique à balayage (MEB)

L'utilisation du microscope électronique à balayage pour l'étude des biofilms a permis de fournir les premières images de la surface des biofilms, révélant des structures en trois dimensions (TRINIDAD *et al.*, 2010). Cette technique est réalisée en plusieurs étapes : la fixation avec de l'aldéhyde, la déshydratation avec une série d'alcool, séchage, puis la métallisation par recouvrement de l'échantillon d'une couche conductrice (tel que le platine) (figure 28) (PRIESTER *et al.*, 2007 ; GUILBAUD *et al.*, 2015 ; ASAHI *et al.*, 2015), dont les électrons libérés par le revêtement métallique de l'échantillon sont capturés par le MEB pour la production d'images (KIRMUSAOGLU, 2019). Toutefois la déshydratation des spécimens engendre des altérations dans la structure de la matrice organique et des images déformées du biofilm sont obtenues (PRIESTER *et al.*, 2007, ; TRINIDAD *et al.*, 2010 ; DOHNALKOVA *et al.*, 2011).

Des protocoles variés sont cités dans la littérature avec des modifications visant à améliorer la visualisation des structures cellulaires par utilisation de colorants tels que le rouge de ruthénium (PRIESTER *et al.*, 2007) et atténuer les déformations dues à la déshydratation de la matrice organique par des méthodes cryogéniques (ALHEDE *et al.*, 2012 ; DOHNALKOVA *et al.*, 2011).

Comme alternative, la microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE) consiste à déposer les échantillons dans une chambre à pression variable sans prétraitement (sans déshydratation et sans utilisation de métaux conducteurs) (WILLIAMS et BLOEBAUM, 2010) et le glycocalyx hautement hydraté du biofilm peut être observé dans son état naturel (TRINIDAD *et al.*, 2010).

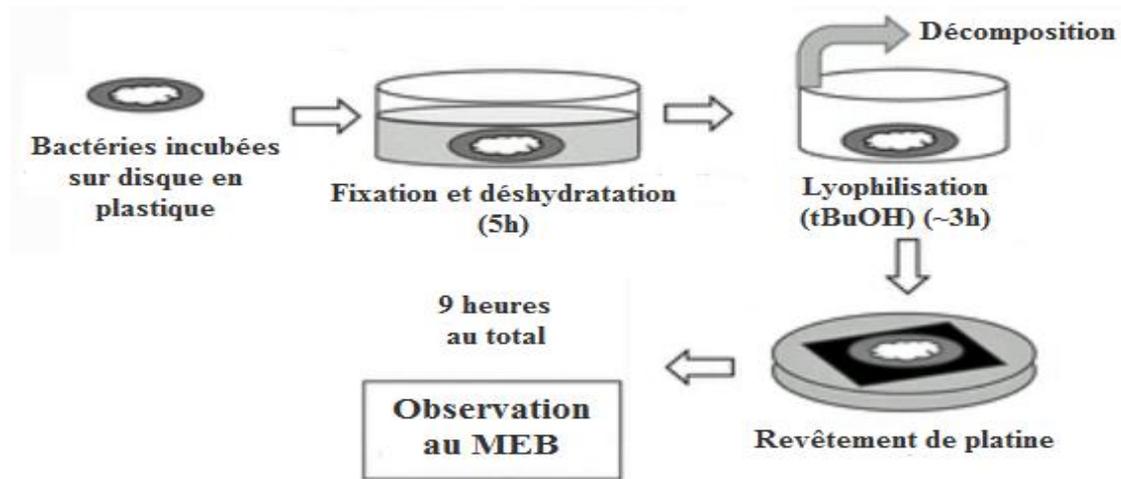


Figure 28 : Prétraitement des échantillons pour observation MEB (ASAHI *et al.*, 2015).

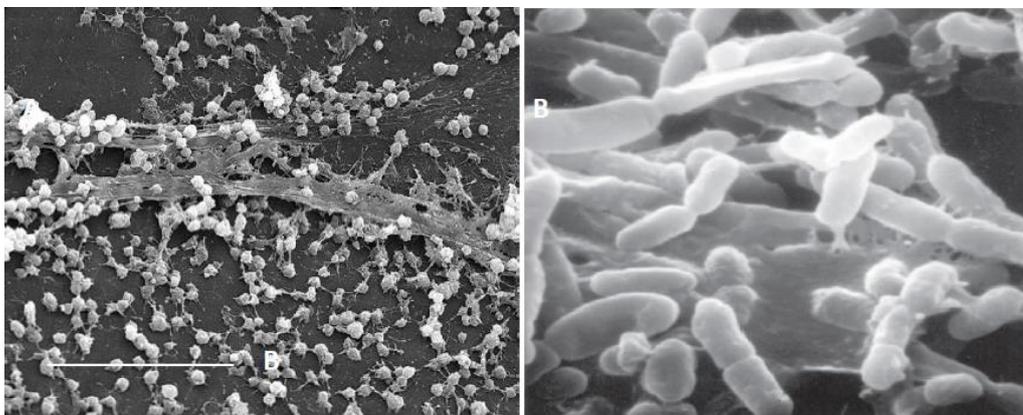


Figure 29 : Micrographes de biofilm obtenus au MEB (A) (DONLAN et COSTERTON, 2002) et (B) montrant l'effondrement de la matrice organique provoqué par la déshydratation de l'échantillon (FLEMMING, 2008).

III-10-1-2-3- Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

Cette technique permet d'observer aussi bien les cellules planctoniques que le biofilm. Elle permet d'aller plus loin dans la visualisation de la structure du biofilm en balayant l'échantillon en profondeur sans déformer ou abimer l'échantillon (DELEO *et al.*, 1997 ; KOKARE *et al.*, 2009), et en multipliant les acquisitions à différentes profondeurs. Il est possible de reconstituer une image en trois dimensions du biofilm et d'acquérir des informations sur son épaisseur, sa rugosité ou son volume (BRIDIER *et al.*, 2010).

Pour l'observation du biofilm avec la microscopie confocale et les méthodes associées, le biofilm doit être fluorescent (KIRMUSAOGLU, 2019). L'emploi de différents fluorochromes permet de localiser et de décrire plus précisément les structures, la composition (polysaccharides, ADN ou protéines), et la répartition spatiale des biofilms (LAZAROVA et MANEM, 1995 ; SURMAN *et al.*, 1996 ; CHEN *et al.*, 2007; ONICIUC *et al.*, 2016). L'utilisation d'un marquage Live/Dead composé de SYTO9 (marqueur vert allant se fixer sur

l'ensemble des cellules) et d'iodure de propidium (marqueur rouge ne se fixant que sur les bactéries avec une membrane altérée) permet d'étudier la viabilité bactérienne et donc l'efficacité de traitements (MARQUES *et al.*, 2015). Il est également possible de modifier génétiquement des souches afin qu'elles expriment elles-mêmes un fluorophore comme la protéine fluorescente verte supprimant l'étape de marquage (TOLKER-NIELSEN et STERNBERG, 2014).

La microscopie confocale peut être couplée à d'autres techniques telles que la spectroscopie Raman, l'avantage de cette combinaison réside dans la facilité de manipulation, l'échantillon ne nécessite aucune préparation ou traitement préalable, et aucun emploi de marqueur ou fluorochrome est exigé (PÄTZOLD *et al.*, 2006 ; SANDT *et al.*, 2007 ; WAGNER *et al.*, 2008 ; ALLAKHVERDIEV *et al.*, 2009).

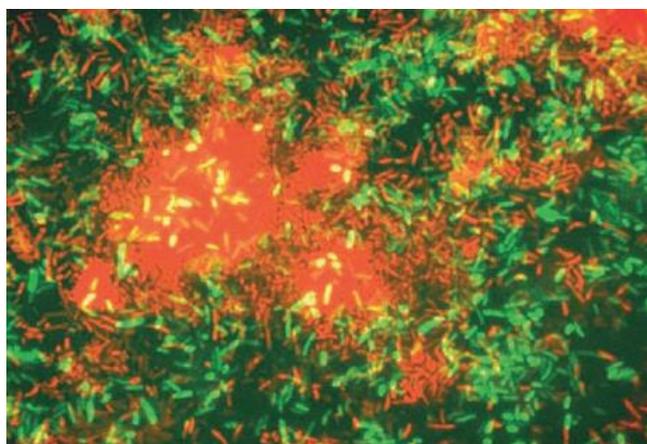


Figure 30 : Communauté bactérienne intégrée dans une matrice de biofilm visualisée par CLSM. Chaque bactérie observée avec une couleur distincte située à différentes profondeurs du biofilm (MADIGAN *et al.*, 2015).

III-10-2- Méthode génotypique

III-10-2-1- Détection des gènes associés au biofilm par PCR

Les techniques de PCR sont utilisées non seulement pour l'identification des agents pathogènes en amplifiant les séquences d'acides nucléiques spécifiques à l'espèce, mais également pour la détection des facteurs de virulence en amplifiant les gènes de virulence cibles tels que les gènes du biofilm à l'aide d'amorces spécifiques aux gènes (KIRMUSAOGLU, 2019). Le gène associé au biofilm est amplifié par PCR, le produit PCR isolé est visualisé sur un gel d'agarose contenant un colorant intercalant l'ADN tel que le bromure d'éthidium pour confirmer la présence de gène amplifié. Uniquement en PCR en temps réel, l'amplicon est détecté par fluorescence à l'aide d'une paire de sondes d'hybridation spécifiques marquées au colorant de fluorescence (MADIGAN *et al.*, 2015).

III-10-2-2- Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

La technique FISH est basée sur l'hybridation d'une sonde marquée par fluorescence à l'ARNr ribosomique (figure 31). Les sondes (courtes séquences d'ADN de 16-20 nucléotides) marquées avec un colorant fluorescent sont complémentaires de la séquence bactérienne de l'ARNr 16S dans les cellules bactériennes (VALPI et BRIDGER, 2008). Grâce à cette méthode, des micro-organismes spécifiques présents dans une communauté de biofilm hétérogène peuvent être identifiés par la méthode des sondes d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Le taux de croissance du micro-organisme dans le biofilm peut être déterminé, en raison des quantités de ribosomes existant dans un micro-organisme, qui sont directement proportionnelles à l'activité de croissance du micro-organisme (KIRMUSAOGLU, 2019).

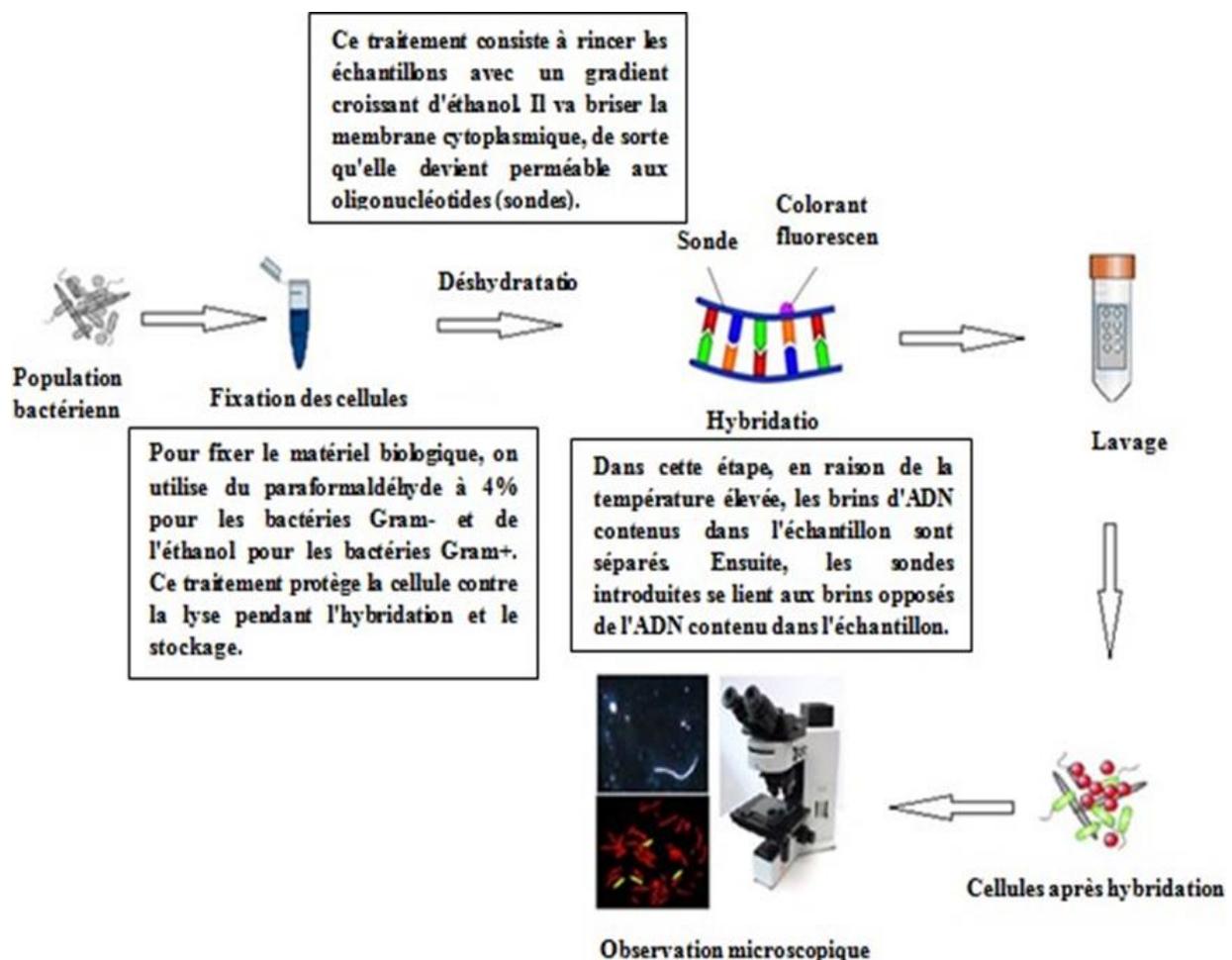


Figure 31: Principales étapes de la méthode d'hybridation *in situ* par fluorescence (WOLF, 2017)

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1- Objectif de l'étude

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la formation de biofilm par des souches de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et animale par deux méthodes phénotypiques (culture sur gélose au Rouge Congo et la méthode de microplaque) et de déterminer leurs profils de résistance vis-à-vis de quelques molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire, et ceci pour prévoir l'existence de souches multirésistantes SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline).

2- Matériel

- Autoclave (pbi international, Italie).
- Bain-Marie (Mettler, Allemagne).
- Balance électronique (Denver Instrument, Etats Unis).
- Bec bunsen.
- Congélateur (Maxipower, Algérie).
- Etuve microbiologique (Mettler, Allemagne).
- Lecteur ELISA (Gentaur, Paris, France).
- Portoir.
- Réfrigérateur (Maxipower, Algérie).
- Spectrophotomètre UV /visible (Medline, Grande Bretagne).
- Vortex (VELP SCIENTIFICA, Italie).
- Verrerie et outils : boîtes de Pétri, tubes à essai, pipettes Pasteur, anse à boucle, Micropipettes, embouts (0.1 et 1mL), spatules, béchers, cuves de spectrophotomètre, flacons en verre, pince bactériologique, écouvillons, microplaques de 96 puits en polystyrène (ProLab Scientific Co Ltd, Zhejiang, China).

3- Matériel biologiques

- Souches de référence : *S. aureus* ATCC 25923 (témoin positif).
- Souches de *S. aureus* d'origine alimentaires et animales.

4- Milieux de culture et réactifs

La composition et la préparation des milieux de culture et des réactifs utilisés sont détaillées dans l'**annexe 01**.

4-1- Milieux de culture

4-1-1- Milieux de culture liquides

- Bouillon Coeur Cerveille (BHIB) (Conda Pronadisa, Espagne).

-Bouillon Tryptone Soja (TSB) (Conda Pronadisa, Espagne) + 1% de Glucose

4-1-2- Milieux de culture solides

-Gélose BHA (Conda Pronadisa, Espagne).

-Gélose Muller-Hinton (Conda Pronadisa, Espagne).

-Gélose au rouge Congo (RCA).

4-2- Réactifs

- Méthanol à 96% (Honeywell, Seelze, Germany).

- Ethanol (Honeywell, Seelze, Germany).

- Tampon phosphate salin (PBS).

- Cristal Violet à 0,5% (Biochem Chemopharma, Nièvre, France).

- Eau physiologique stérile.

- Disques d'antibiotiques (Liofilchem, Italy).

5- Méthodes

5-1- Lieu et durée de l'étude

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologie à l'université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou durant une période de deux mois.

5-2- Origine des souches testées

Durant cette période, 355 souches de *S. aureus* incluant des souches isolées de la cavité nasale des animaux (poulets de chair, vaches et chèvres) et celles isolées de produits alimentaires (lait et produits laitiers, pâtisseries et viandes hachées) ont été revivifiées. Certaines souches ont été isolées cette année et d'autres isolées les années précédentes de la région de Tizi Ouzou, conservées au congélateur à -20°C, après leur caractérisation génotypique (confirmation de l'espèce et recherche des gènes codant pour des entérotoxines staphylococciques) (**Annexe 02**).

5-3- Revivification des souches de *S. aureus*

La revivification des souches a été réalisée par un enrichissement sur le bouillon BHIB, l'incubation est faite à 37°C pendant 24h. À partir des bouillons BHIB présentant un trouble, des ensemencements, par stries sur des boîtes contenant de la gélose BHA, ont été réalisés, suivis d'une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

5-4- Purification des souches

Dans le cas d'une culture non pure, la purification des souches *S. aureus* a été effectuée sur la gélose cœur cerveau BHA. Ainsi, des repiquages successifs ont été réalisés sur le même type de milieu jusqu'à obtenir une culture pure, avec des colonies présentant les mêmes

caractéristiques macroscopiques.

5-5- Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches *S. aureus* isolées a été étudiée conformément aux recommandations du CLSI 2018 (Clinical and Laboratory Standards Institute), en appliquant la méthode de diffusion de disques d'antibiotiques sur la gélose Mueller Hinton (MH). La sensibilité des souches a été testée vis-à-vis de 9 molécules d'antibiotiques listées dans le tableau suivant.

Tableau II : Listes des molécules d'antibiotiques testées.

Famille	Antibiotiques	Abréviation	Charge en µg	Marque
β-lactamines	Pénicilline G	P	10	Liofilchem, Italie
	Céfoxitine	FOX	30	Liofilchem, Italie
Aminoglycoside	Gentamycine	CN	10	Liofilchem, Italie
	Néomycine	N	30	Liofilchem, Italie
Macrolides	Erythromycine	E	15	Liofilchem, Italie
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30	Liofilchem, Italie
Quinolones	Ofloxacin	OFX	5	Liofilchem, Italie
Phénicol	Chloramphénicol	C	30	Liofilchem, Italie
Association	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	SXT	25	Liofilchem, Italie

- **Technique**

Un inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18h. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse à boucle, déchargée dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est homogénéisée au vortex et ajustée à une densité optique comprise entre 0,08-0,10 lue à 625nm au spectrophotomètre. La suspension bactérienne est ajustée soit en ajoutant de la culture à la suspension soit de l'eau physiologique stérile.

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface gélosée du milieu Mueller Hinton, préalablement coulé en boîtes de Pétri, 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. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'une boîte de Pétri est ensemencée.

Trois disques d'antibiotiques sont appliqués par boîte à l'aide d'une pince stérile puis laissés diffuser pendant 15min à température ambiante. Les boîtes sont, ensuite, incubées immédiatement pendant 18 heures à 37°C (CLSI, 2018).

La souche de contrôle de qualité est *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 traitée dans les mêmes conditions que les souches à tester. Ce contrôle valide le résultat du test et permet de contrôler les disques d'antibiotiques et la qualité du milieu Mueller-Hinton.

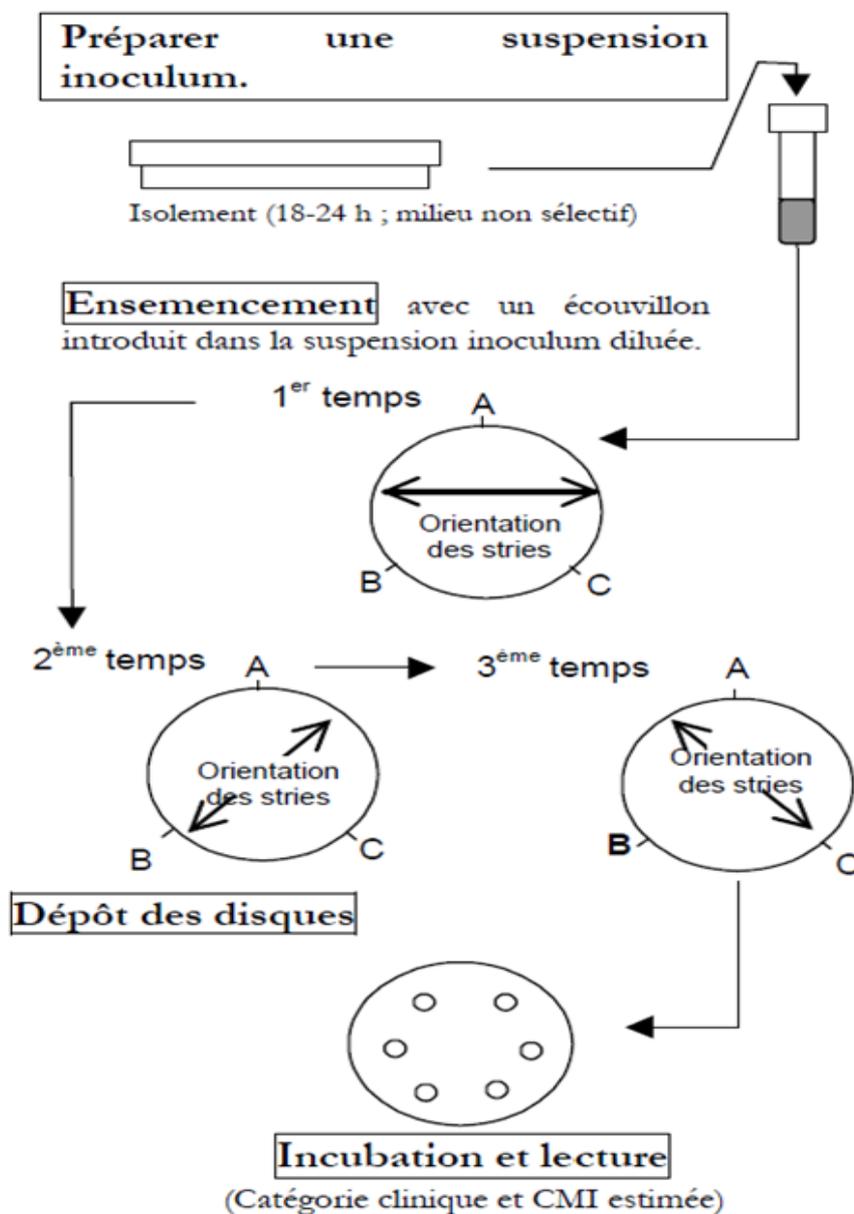


Figure 32 : Antibiogramme standard par méthode de diffusion de disque sur gélose.

- **Lecture**

La lecture de l'antibiogramme se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

L'interprétation des résultats a été faite selon les recommandations du CLSI (2018) et CASFM (2020), les souches sont classées en : souches sensibles, souches intermédiaires et souches résistantes (**Annexe 03**).

5-6- Evaluation de la formation de biofilms *in vitro*

Deux méthodes ont été utilisées pour détecter la production de biofilm, la méthode de culture sur la gélose au rouge congo (RCA) et la méthode de plaque de culture de tissus (TCP).

5-6-1- Culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

Cette technique qualitative consiste à l'ensemencement des souches pour tester leur capacité à produire du slime sur la gélose au rouge congo (CHAIEB *et al.*, 2005). Le milieu préalablement préparé est ensemencé par des striés serrés, à partir des cultures jeunes, puis incubé à 37°C pendant 24h à 48h (MATHUR *et al.*, 2006).

Les souches productrices de slime (les souches exprimant le PIA) donnent des colonies noires ou plus ou moins noires sur milieu RCA, contrairement aux souches non productrices qui sont rouge (NASR *et al.*, 2012).

5-6-2- Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

La détermination quantitative de la formation de biofilms dans les microplaques à 96 puits est basée sur la mesure colorimétrique du cristal violet fixé par les cellules sessiles. Cette méthode a été réalisée selon le protocole décrit par ACHEK *et al* (2020), avec quelques modifications.

Brièvement, quelques colonies de *S. aureus* ont été inoculées dans 5 ml de TSB +1% glucose, suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h. Les suspensions bactériennes obtenues ont été ensuite diluées à 1/50 avec du bouillon TSB-1% glucose. Ainsi, 200µl de la suspension bactérienne diluée ont été transférés dans un puit d'une microplaque en polystyrène à 96 puits, trois puits sont réservés pour chaque souche. Le TSB-1% glucose a servi de contrôle négatif. Tandis que, la souche de *S. aureus* ATCC 25923 a servi de contrôle positif. La microplaque est recouverte puis incubée à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation, le contenu des puits a été délicatement retiré et lavé avec 200µl du tampon phosphate salin (PBS). Les cellules bactériennes adhérentes ont été fixées avec du méthanol pendant 15 min et colorées avec du cristal violet à 0,5 % (150µl /puits) pendant 15 min. Trois lavages doux ont été appliqués pour éliminer l'excès du colorant. Le cristal violet fixé a été solubilisé en ajoutant dans chaque puit 150µl d'éthanol à 96 %. La microplaque est couverte et maintenue sans agitation pendant 30 min. La mesure de la densité optique (DO) a été réalisée à 560nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

L'interprétation de la production de biofilm a été faite selon les critères décrits par Achek *et al* (2020) (tableau III), les souches ont été classées comme suit :

Tableau III : Classification de l'adhésion des *Staphylocoque spp* (ACHEK *et al.*, 2020).

Valeur DO	Formation de biofilm
ODs < ODc	Non formatrice
ODc < ODs < 2 ODc	Faible
2 ODc < ODs < 4 ODc	Modérée
ODs > 4 ODc	Forte

ODs : la valeur moyenne de la densité optique pour chaque souche.

ODc : cut-off value, avec ODc = valeur moyenne de la densité optique du control négatif + 3 fois l'écart type du contrôle négatif.

OD negative control = la valeur moyenne de la densité optique pour chaque témoin négatif (cette valeur est calculée pour chaque microplaque lors de chaque essai).

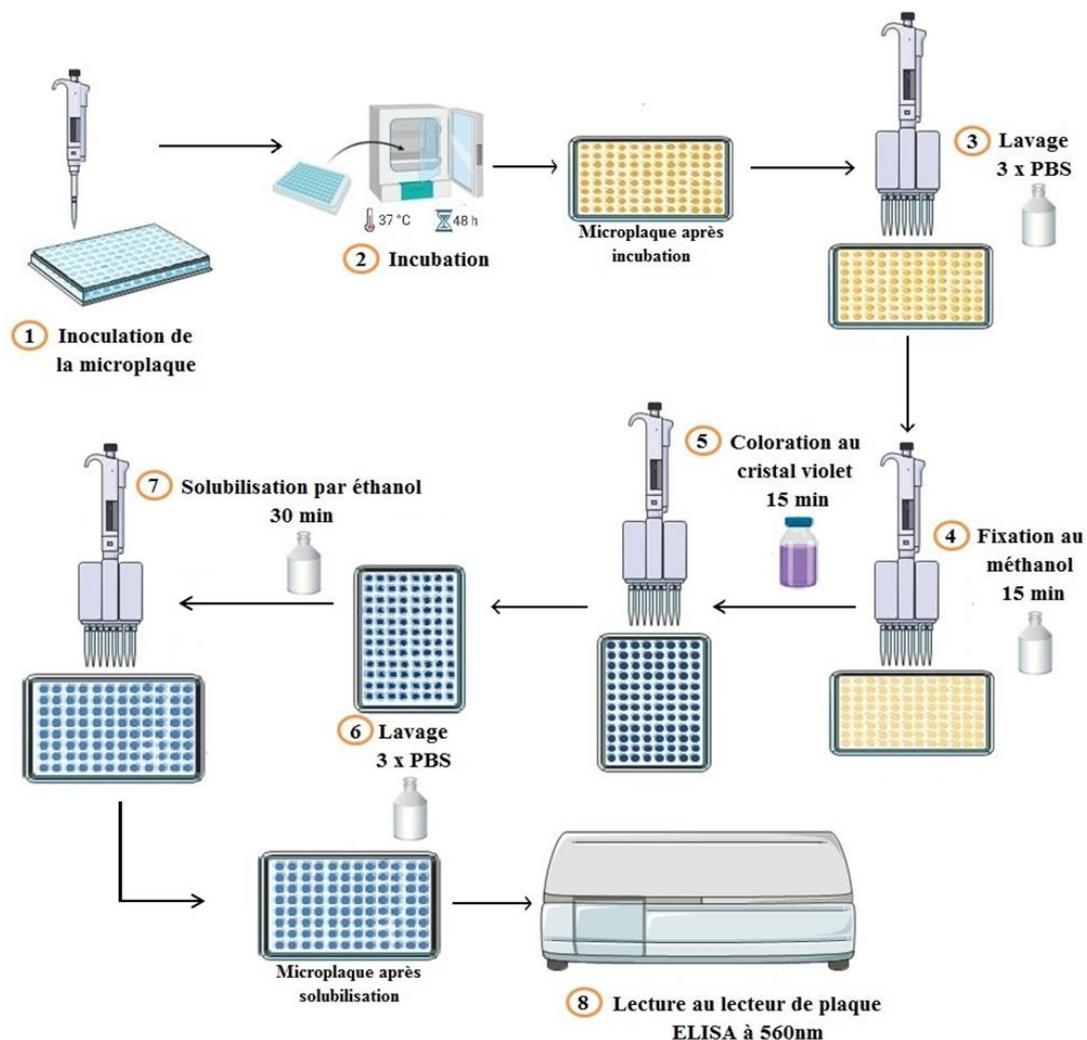


Figure 33 : Méthode de plaque de culture de tissus.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1- Résultats

1-1- Nombre de souches testées

Durant cette étude, 355 souches de *S. aureus* préalablement isolées, identifiées puis conservées au congélateur à -20°C ont fait l'objet d'une revivification sur le bouillon BHIB (figure 34A). Après revivification et repiquage sur la gélose BHA (figure 34B), nous avons obtenus 177 souches, qui ont fait l'objet de l'étude de leur antibiorésistance et leur capacité à former des biofilms.

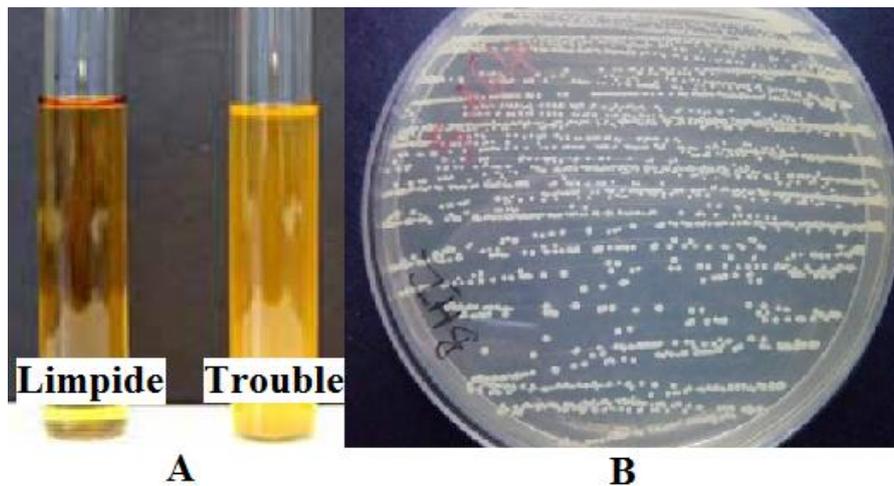


Figure 34 : A, culture sur BHIB. B, aspect des colonies de *S. aureus* sur la gélose BHA (photo prise au laboratoire).

Le tableau ci-dessous représente la répartition des souches *S. aureus* en fonction de leurs origines et la nature du produit.

Tableau IV : Nombre de souches d'origine alimentaire et animale.

Origine	Nature du produit	Nombre de souche	Total
Alimentaire	Beurre	2	80
	Lait acidifié (l'ben)	12	
	Lait cru	45	
	Pâtisserie	15	
	Rayeb	3	
	Viande hachée	3	
Animale	Portage nasal bovin	13	97
	Portage nasal caprin	54	
	Portage nasal poulet de chair	30	
Total		177	

1-2- Antibiorésistance des souches isolées

Les résultats obtenus révèlent l'existence de résistances, avec des proportions variables selon les différentes familles étudiées. En effet, une forte résistance a été enregistrée vis-à-vis de la pénicilline, aussi bien pour les souches d'origine alimentaire et celles d'origine animale, avec des taux de 91,25% et 58,76%, respectivement. Une résistance relativement importante (41,25%) a été aussi observée vis-à-vis de la tétracycline, concernant les souches d'origine alimentaire. De faibles résistances ont été enregistrées vis à vis les autres molécules d'antibiotiques (tableau V, figure 35).

Tableau V : Fréquence de résistance des souches *S. aureus* aux antibiotiques.

Antibiotique	Nombre de souches résistantes (%)		Total
	Alimentaire	Animale	
Pénicilline G	73 (91,25%)	57 (58,76%)	130 (73,32%)
Céfoxitine	12 (15,38%)	7 (9,93%)	19 (10,73%)
Gentamycine	0	5 (4,95%)	5 (2,82%)
Néomycine	21 (26,92%)	10 (10,30%)	31 (17,51%)
Erythromycine	4 (5,13%)	20 (19,80%)	24 (13,55%)
Tétracycline	33 (41,25%)	13 (13,40%)	46 (25,98%)
Ofloxacine	9 (11,54%)	5 (4,95%)	14 (7,90%)
Chloramphénicol	2 (2,56%)	9 (8,91%)	11 (6,21%)
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	0	8 (7,92%)	8 (4,51%)

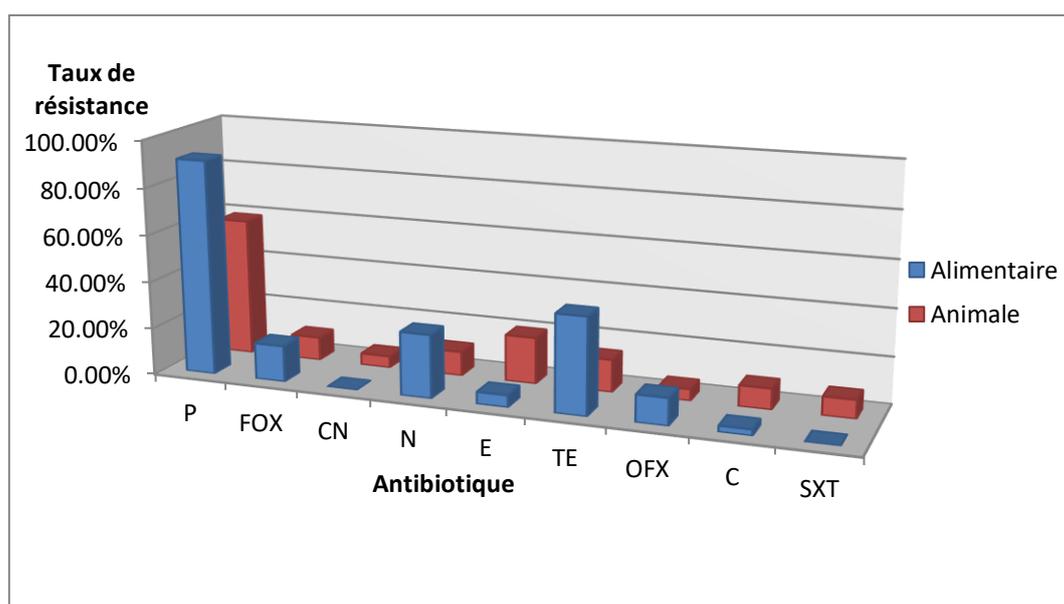


Figure 35 : Fréquence de résistance des souches *S. aureus* aux antibiotiques.

Les deux tableaux ci-dessous représentent le nombre de souches *S. aureus* d'origine alimentaire (tableau VI) et animale (tableau VII) résistantes aux différents antibiotiques testés.

Tableau VI: Nombre de souches *S. aureus* d'origine alimentaire résistantes aux antibiotiques.

Type de produit	Nombre de souches résistantes								
	P	FOX	CN	N	E	TE	OFX	C	SXT
Beurre	2	0	0	2	0	1	0	0	0
L'ben	10	2	0	4	0	8	2	0	0
Lait cru	41	8	0	6	2	21	7	0	0
Pâtisserie	15	0	0	5	0	0	0	0	0
Rayeb	3	2	0	2	2	3	0	2	0
Viande hachée	2	0	0	2	0	0	0	0	0

Tableau VII : Nombre de souches *S. aureus* d'origine animale résistantes aux antibiotiques.

Type de produit	Nombre de souches résistantes								
	P	FOX	CN	N	E	TE	OFX	C	SXT
PNB	7	2	0	2	1	7	0	0	0
PNC	24	2	5	5	5	2	2	6	2
PNPC	26	3	0	3	14	4	3	3	6

PNB: Portage nasal bovin ; PNC : Portage nasal caprin ; PNPC: Portage nasal poulet de chair.

1-3- Nombre et phénotypes des souches multirésistantes

Au total, trente-huit souches (21.43%) expriment une multirésistance pour trois antibiotiques ou plus, dix phénotypes de multirésistance ont été observés (tableau VIII).

Tableau VIII : Phénotypes de multirésistance des souches *S. aureus*.

Origine	Phénotype de multirésistance	Nombre de souches
Alimentaire	P-N-TE	9
	P-FOX-TE-OFX	9
	P-FOX-N-E-TE	1
	P-FOX-E-TE-C	1
	P-FOX-N-E-TE-C	1
Animale	P-E-OFX	3
	P-E-SXT	4
	P-N-E-SXT	4
	P-E-TE-OFX	1
	P-FOX-E-TE-C	4
	P-FOX-CN-N-E-TE-C	1
Total	38 (21.43%)	

1-4- Prévalence de *Staphylococcus aureus* résistant à la métilcilline

Selon les résultats des antibiogrammes réalisés, 19 souches de *S. aureus* ont montré une résistance à la céfoxitine. Ces dernières ont été qualifiées comme étant des *S. aureus* résistants à la métilcilline (SARM) (figure 36 et figure 37). Dans la présente étude, la plupart des souches SARM ont été isolées de denrées alimentaires, en particulier du lait cru et de produits laitiers traditionnels, suivies de celles isolées des cavités nasales des animaux (figure 38).

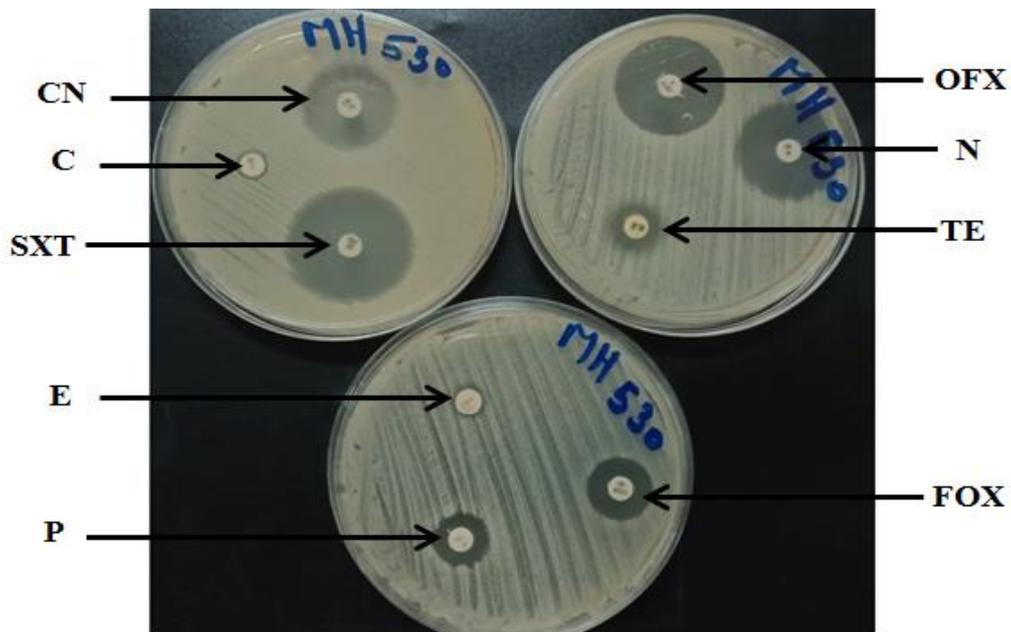


Figure 36 : Profil de résistance d'une souche SARM d'origine animale.

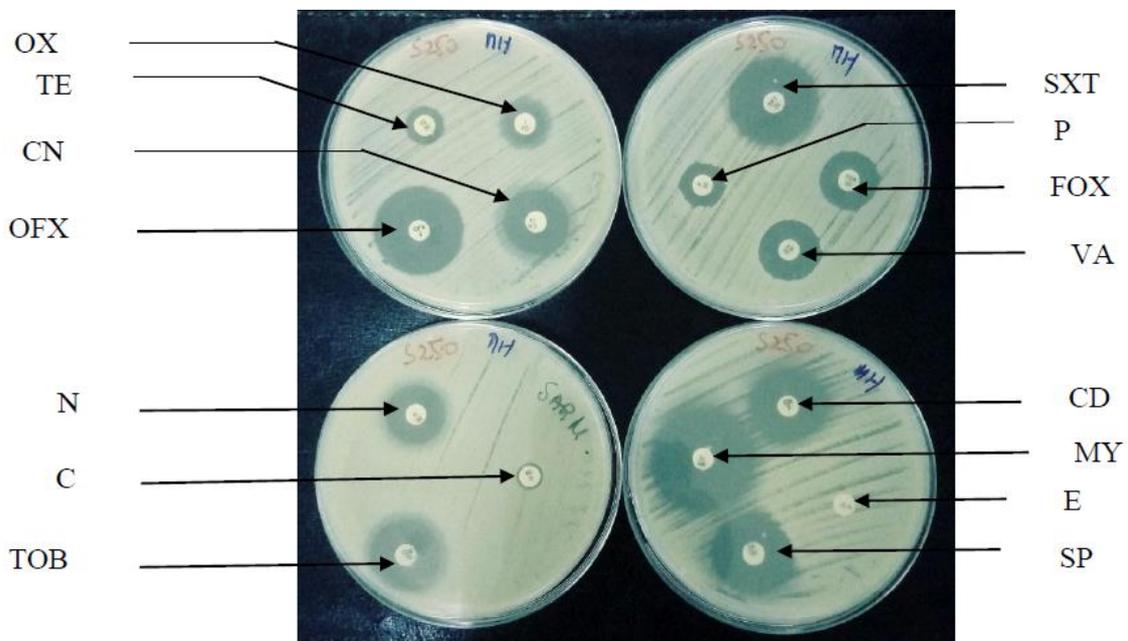


Figure 37 : Profil de résistance d'une souche SARM d'origine alimentaire.

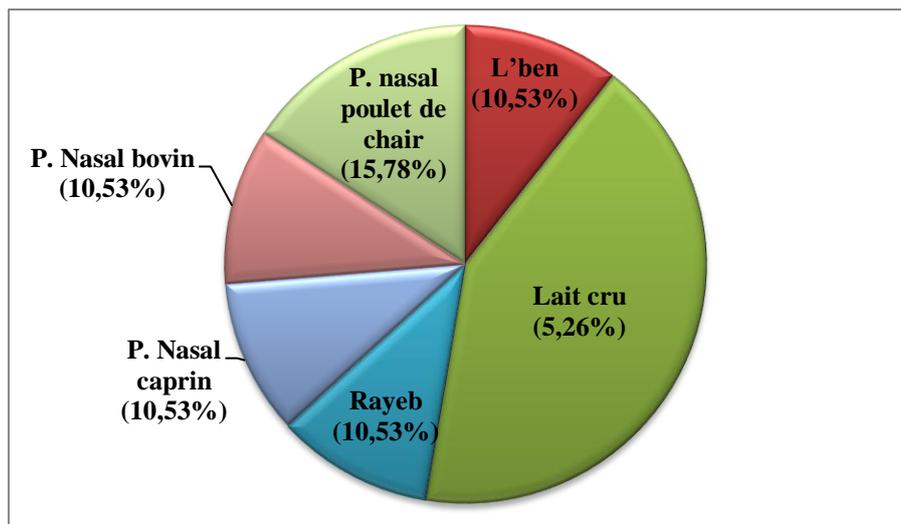


Figure 38 : Répartition des souches SARM en fonction de la nature du produit.

L'antibiorésistance des souches de SARM a révélé que 89.48% de ces souches étaient multirésistantes avec cinq phénotypes de multirésistance ont été observés (tableau IX).

Tableau IX : Phénotypes de résistance des souches SARM.

Phénotype de résistance	Nombre de souches SARM
C-CN-E-FOX-N-P-TE	1
C-E-FOX-N-P-TE	1
C-E-FOX-P-TE	5
E-FOX-N-P-TE	1
FOX-N-P	1
FOX-OFX-P-TE	9
FOX-P-TE	1
Total	19

En plus de leurs résistances aux bêta-lactamines, les souches SARM isolées ont exprimé des résistances vis-à-vis d'autres familles d'antibiotiques, à savoir les tétracyclines, les macrolides (érythromycine), les phénicoles (chloramphénicol), les aminosides (gentamicine et néomycine) et les fluoroquinolones (ofloxacine).

1-5- Détection de la formation de biofilm chez les souches de *S. aureus* isolées

Nos isolats ont été testés pour mettre en évidence leur capacité à former de biofilm *in vitro*, ceci par la méthode quantitative de coloration au cristal violet sur microplaque de 96 puits et la méthode de culture sur gélose au rouge congo (RCA).

1-5-1- Méthode de culture sur la gélose au rouge de congo (RCA)

La capacité de production de slime a été déterminée sur la base de la morphologie des colonies qui s'étaient développées sur la gélose au rouge de congo, les souches productrices de slime avaient une couleur noire ou plus au moins noires à l'opposé des non formatrice, qui présentent des colonies rouges (figure 39). Les résultats obtenus sont illustrés dans **Annexe**

05.

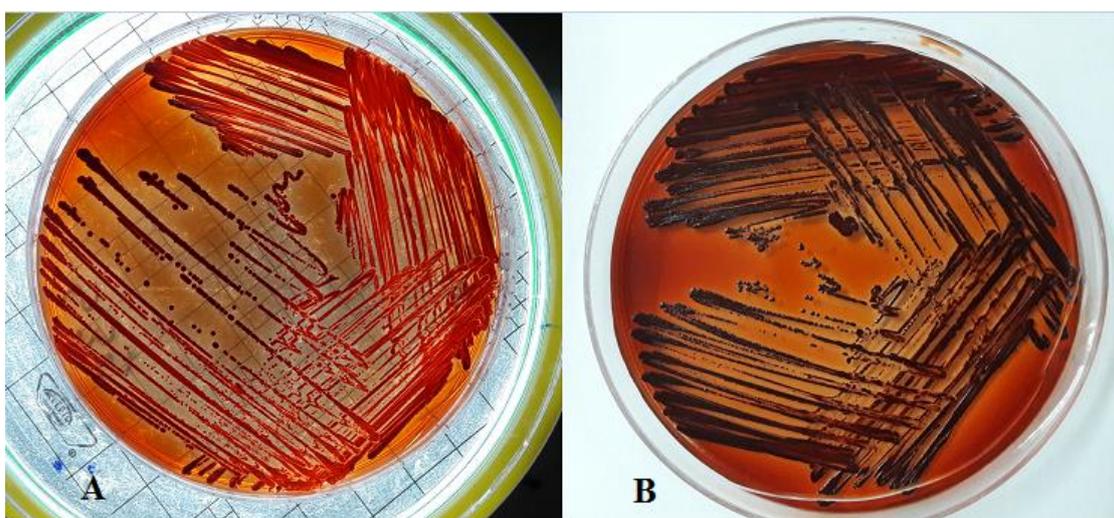


Figure 39 : Production de slime chez les souches *S. aureus* sur la gélose au rouge de congo, (A) souche non productrice de slime et (B) souche productrice du slime.

Les tableaux ci-dessous représentent la distribution des souches *S. aureus* d'origine alimentaire (tableau X) et animale (tableau XI) en fonction de la production de slime bactérien. La majorité (80%) des souches alimentaires sont productrices de slime bactérien. Tandis que, uniquement la moitié des souches d'origine animale ont cette capacité.

Tableau X : Répartition des souches *S.aureus* d'origine alimentaire en fonction de la production de slime bactérien.

Nature du produit	Nombre de souches	Production de slime	
		Non productrice	Productrice
Beurre (B)	2	1 (50%)	1 (50%)
Lait acidifié (LA)	12	3 (25%)	9 (75%)
Lait cru (LC)	45	10 (22.22%)	35 (77.78%)
Pâtisserie (P)	15	1 (6.67%)	14 (93.33%)
Rayeb (R)	3	1 (33.33%)	2 (66.67%)
Viande hachée (VH)	3	0	3 (100%)
Total	80	16 (20%)	64 (80%)

Tableau XI : Répartition des souches *S.aureus* d'origine animale en fonction de la production de slime bactérien.

Nature du produit	Nombre de souches	Production de slime	
		Non productrice	Productrice
Portage nasal bovin (PNB)	13	7 (53.85%)	6 (46.15%)
Portage nasal caprin (PNC)	54	28 (51.85%)	26 (48.15%)
Portage nasal poulet de chair (PNPC)	30	9 (30%)	21 (70%)
Total	97	44 (45.36%)	53 (54.64%)

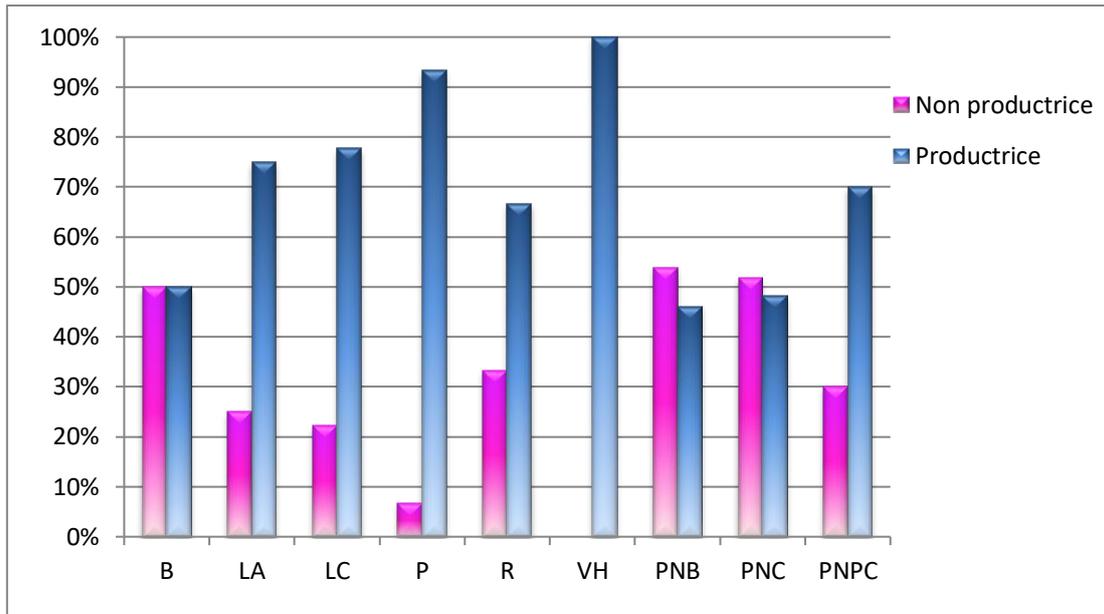


Figure 40 : Répartition des souches en fonction de la production de slime bactérien.

1-5-2- Technique de plaque de Culture de Tissu (TCP)

Après 24 heures d'incubation à 37°C sur une surface hydrophobe (polystyrène) et coloration au cristal violet (figure 41 et figure 42), la formation des biofilms a été quantifiée par la mesure des densités optiques à une longueur d'onde de 560nm.

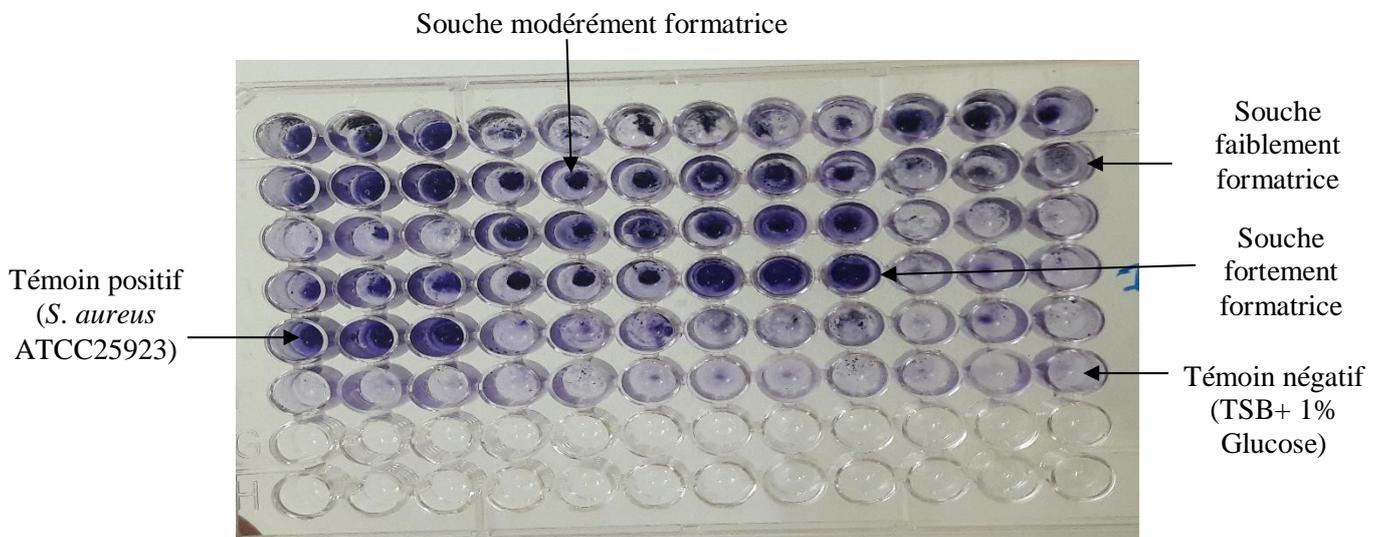


Figure 41 : Formation de biofilm sur la microplaque chez des souches de *S. aureus* d'origine alimentaire après coloration au cristal violet.

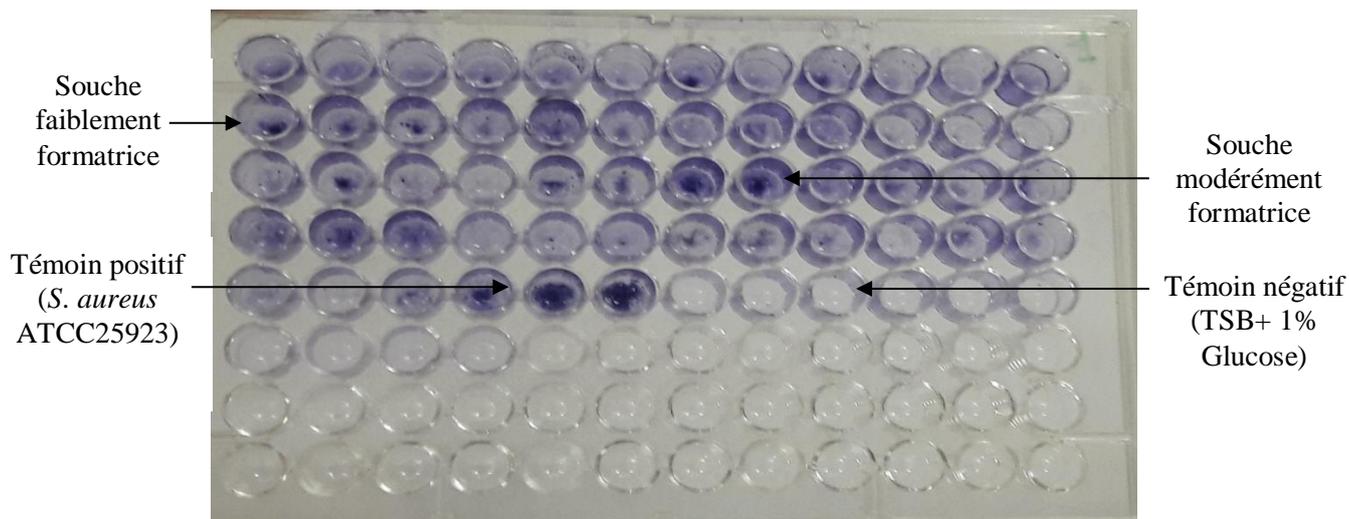


Figure 42 : Formation de biofilms sur la microplaque chez des souches de *S. aureus* d'origine animale après coloration au cristal violet.

Au total 11 microplaques ont été réalisées, les valeurs des densités optiques (DOs) obtenues par le lecteur d'absorbance et les valeurs calculées des ODC pour chaque essai sont illustrées en **Annexe 05**.

Les résultats de la formation de biofilms sur les microplaques en polystyrène après 24 heures d'incubation repartis en fonction des échantillons sont représentés dans le tableau ci-dessous. Toutes les souches, quel que soit leurs origines, sont formatrices de biofilms, avec une capacité variable. En effet, plus de la moitié (59,89%) des souches sont fortement formatrices. Tandis que, le reste des souches sont soit moyennement ou faiblement formatrices de biofilms (tableau XII).

Tableau XII : Distribution des souches *S. aureus* formatrices de biofilm.

Origine	Nature du produit	Nombre de souches	Formation de biofilm		
			Faible	Moderée	Forte formatrice
Alimentaire	Beurre	2	0	0	2 (100%)
	Lait acidifié	12	0	2 (16,67)	10 (83,33%)
	Lait cru	45	4 (8,89%)	20 (44,44%)	21 (46,67%)
	Pâtisserie	15	0	10 (66,67%)	5 (33,33%)
	Rayeb	3	0	0	3 (100%)
	Viande hachée	3	0	0	3 (100%)
Animale	P. nasal bovin	13	0	0	13 (100%)
	P. nasal caprin	54	5 (9,26%)	16 (29,63%)	33 (61,11%)
	P. nasal poulet de chair	30	2 (6,67%)	12 (40%)	16 (53,33%)
Total		177	11 (6,21%)	60 (33,90%)	106 (59,89%)

P. nasal : portage nasal.

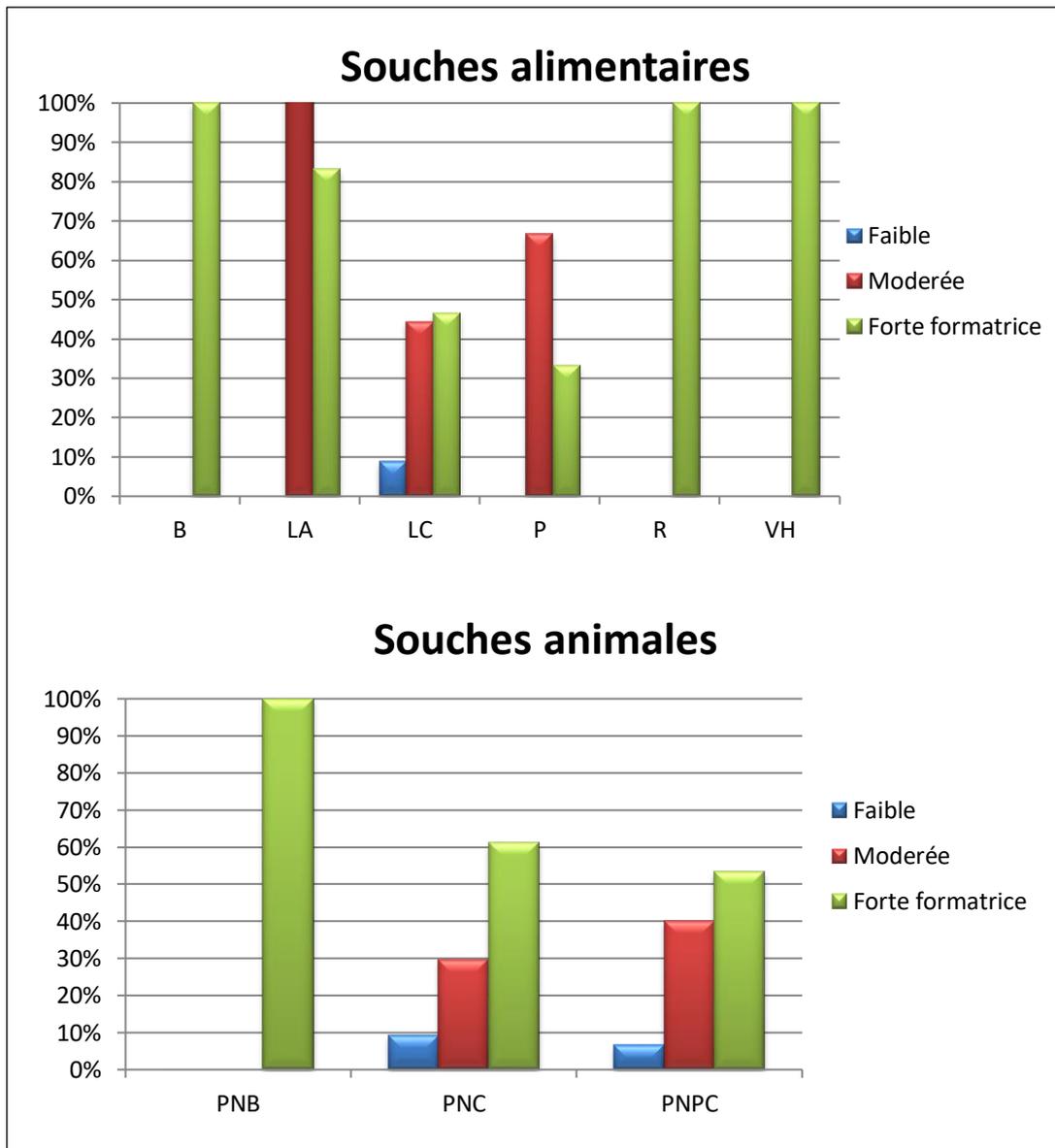


Figure 43 : Distribution des souches *S. aureus* formatrice de biofilm d'origine alimentaire et animale.

B: Beurre ; LA : Lait acidifié ; LC: Lait cru ; P: Pâtisserie ; R: Rayeb ; VH: Viande hachée
 PNB: Portage nasal bovin ; PNC: Portage nasal caprin ; PNPC: Portage nasal poulet de chair.

Les deux tableaux ci-dessous représentent le lien entre la capacité des souches *S. aureus* d'origine alimentaire et animale à former de biofilm à l'aide du test TCP et leur résistance aux antibiotiques (tableau XIII), ainsi que la distribution des gènes codant des entérotoxines staphylococciques (tableau XIV).

Tableau XIII : Lien entre la capacité de formation de biofilm à l'aide du test TCP et la résistance aux antibiotiques.

Critères		Isolats alimentaires (N = 80)			Isolats animaux (N = 97)		
		Faible (N = 4)	Modéré (N = 32)	Forte (N = 44)	Faible (N = 7)	Modéré (N = 28)	Forte (N = 62)
Résistance aux antibiotiques	Pénicilline G	4 (100%)	30 (93.75%)	39 (88.63%)	3 (42.85%)	11 (39.28%)	43 (69.35%)
	Céfoxitine	0	6 (18.75%)	6 (13.63%)	1 (14.28%)	0	6 (9.67%)
	Gentamycine	0	0	0	0	2 (7.14%)	3 (4.83%)
	Néomycine	0	5 (15.62%)	16 (36.36%)	0	2 (7.14%)	8 (12.90%)
	Erythromycine	1 (25%)	1 (3.13%)	2 (4.54%)	3 (42.85%)	8 (28.57%)	9 (14.51%)
	Tétracycline	1 (25%)	11 (34.73%)	21 (47.72%)	1 (14.28%)	0	12 (19.35%)
	Ofloxacine	0	5 (15.62%)	4 (9.09%)	1 (14.28%)	3 (10.71%)	1 (1.61%)
	Chloramphénicol	0	0	2 (4.54%)	2 (28.57%)	2 (7.14%)	5 (8.06%)
	Triméthoprim- Sulfaméthoxazole	0	0	0	1 (14.28%)	4 (14.28%)	3 (4.83%)
Aucune résistance		0	1 (3.13%)	4 (9.09%)	3 (42.85%)	14 (50%)	15 (24.19%)

Tableau XIV : Lien entre la capacité de formation de biofilm à l'aide du test TCP et la distribution des gènes codant des entérotoxines.

Critères		Isolats alimentaires (N = 80)			Isolats animaux (N = 18)		Taux de détection de gène d'entérotoxine (N = 98)
		Faible (N = 4)	Modéré (N = 32)	Forte (N = 44)	Faible (N = 1)	Forte (N = 17)	
Gène d'entérotoxine	<i>sea</i>	0	4 (12.5%)	3 (6.82%)	0	0	7 (7.14%)
	<i>seb</i>	0	8 (25%)	17 (38.64%)	0	0	25 (25.51%)
	<i>sec</i>	0	0	2 (4.55%)	0	2 (11.76%)	4 (4.08%)
	<i>sed</i>	0	0	0	1 (100%)	3 (17.65%)	4 (4.08%)
	<i>see</i>	0	1 (3.13%)	0	0	0	1 (1.02%)
	<i>seg</i>	0	2 (6.25%)	4 (9.09%)	1 (100%)	3 (17.65%)	10 (10.20%)
	<i>seh</i>	0	4 (12.5%)	0	0	0	4 (4.08%)
	<i>sei</i>	0	2 (%)	4 (9.09%)	1 (100%)	3 (17.65%)	10 (10.20%)
	<i>sej</i>	0	0	1 (2.27%)	1 (100%)	3 (17.65%)	5 (5.10%)
	<i>sep</i>	1 (25%)	6 (18.75%)	5 (11.36%)	0	0	12 (12.24%)
	<i>ser</i>	0	0	1 (2.27%)	1 (100%)	5 (29.41%)	7 (7.14%)
Aucun gène		3 (75%)	16 (50%)	19 (43.18%)	0	11 (64.71%)	49 (50%)

II- Discussion

Antibiorésistance de *S. aureus*

L'émergence et la propagation de la résistance aux antimicrobiens ont généralement été attribuées à l'utilisation abusive ou irrationnelle des antibiotiques en tant que médicaments thérapeutiques dans les soins de santé humaine et animale ou en tant que hormones de croissance dans l'élevage vétérinaire (RUIZ et ALVAREZ-ORDOÑEZ, 2017).

Les résultats de l'antibiorésistance des souches révèlent l'existence de fortes résistances chez les souches alimentaires à l'encontre de la pénicilline G (91,25%). Nos résultats concordent avec ceux annoncés par plusieurs auteurs qui signalent de fortes résistances vis-à-vis de cette molécule. TITOUCHE *et al* (2020), ont annoncé un taux de résistance de 95,19 % vis-à-vis de la pénicilline concernant des souches provenant du lait cru et ces dérivés, de pâtisserie et de viande hachée. Un résultat similaire est observé par ACHEK *et al* (2018) et CHAALAL *et al* (2018), qui ont enregistré des taux de 100% et 63,6%, respectivement. Quant aux souches animales, le taux détecté (~ 59%) est nettement inférieur à ce qui est rapporté dans la littérature. En effet, une résistance de 96,25% a été signalée par PAPADOPOULOS *et al* (2019) contre des souches de *S. aureus* isolées de bovins et de caprins, une forte résistance a été aussi rapportée par BOUNAR-KECHIH *et al* (2018) de l'ordre de 92% concernant des souches de *S. aureus* isolées du poulet de chair.

La forte résistance à la pénicilline est due probablement à la production de β -lactamases, enzymes inactivant la pénicilline et d'autres molécules appartenant à la famille des β -lactamines (MORONI *et al.*, 2006). Selon DAUREL et LECLERCQ (2008), la sensibilité des souches de *S.aureus* aux bêtalactamines varie selon la molécule, 80 % à 95 % des souches produisent une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*.

PAPADOPOULOS *et al* (2019) ont signalé une résistance de l'ordre de 41% vis-à-vis de la gentamicine pour des souches de *S. aureus* d'origine bovine et caprine. En revanche, dans cette présente étude, une faible résistance à l'encontre de cette molécule a été observée, qui est de l'ordre de 5%. Contrairement aux souches alimentaires dont le taux de sensibilité est de 100%, nos résultats sont similaires à ceux de MAIRI *et al* (2019) et ACHEK *et al* (2018).

Une faible résistance vis-à-vis de la néomycine est enregistrée à l'encontre des souches alimentaires. Notre résultat concorde avec ceux de TITOUCHE *et al* (2020). De faibles résistances ont été par ailleurs décrites par TITOUCHE *et al* (2019) et MATALLAH *et al* (2019), avec des taux de 1,4% et 1,05%, respectivement concernant des souches isolées de

divers produits laitiers. À propos des souches animales, le taux enregistré rejoint celui annoncé par BOUNAR-KECHIH *et al* (2018), qui ont rapporté des taux faibles de résistances (10%, 11%) concernant des souches de *S. aureus* d'origine bovine et aviaire.

Quatre souches se sont avérées résistantes à l'érythromycine, ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par une étude antérieure (TITOUCHE *et al.*, 2020). Tandis qu'une vingtaine de souches animales (~ 20%) ont été résistantes à cette molécule, ces résultats corroborent avec ceux de PAPADOPOULOS *et al* (2019).

De fortes résistances à la tétracycline ont été observées à l'encontre des souches alimentaires, avec un taux de 41,03%, cette résistance semble moins importante que celles annoncées par TITOUCHE *et al* (2020) et ACHEK *et al* (2018), qui ont rapporté des taux de 47,8% et 45,45%, respectivement. Concernant les souches animales, un taux relativement faible a été signalé (13,86%). Ces résultats corroborent ceux observés par AKKOU *et al* (2016) concernant des souches bovines.

Une faible résistance de l'ordre de 5% a été détectée chez les souches animales à l'encontre de l'ofloxacine, résultat nettement supérieur à ceux rapportés par MAIRI *et al* (2019) et AKKOU *et al* (2016), qui ont signalé des taux nuls chez l'espèce bovine. Un taux de résistance légèrement élevé a été observé contre les souches d'origine alimentaire. Nos résultats rejoignent ceux de CHAALAL *et al* (2018) et TITOUCHE *et al* (2019).

Une légère résistance a été enregistré vis à vis le chloramphénicol, aussi bien chez les souches alimentaires que animales, ce qui suggère son utilisation en médecine vétérinaire. Ces résultats corroborent ceux observés par TITOUCHE *et al* (2020). Tandis que, PAPADOPOULOS *et al* (2019) et AKKOU *et al* (2016) n'ont pas signalé de résistance chez les souches d'origine animales.

Sachant que, le chloramphénicol est interdit dans les élevages des animaux de rente en union européenne et réservé uniquement pour la médecine humaine. Bien que, des résidus de chloramphénicol ont été détectés dans les tissus d'animaux en Pologne, ce qui suggère son utilisation en pratique vétérinaire (EFSA, 2014).

Toutes les souches alimentaires se sont révélées sensibles à l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole, ce qui est en accord avec les résultats de plusieurs auteurs (ACHEK *et al.*, 2018 ; MATALLAH *et al.*, 2019 ; TITOUCHE *et al.*, 2019 ; TITOUCHE *et al.*, 2020). Alors que, CHAALAL *et al* (2018) ont signalé une faible résistance de l'ordre de 1.9%. Tandis que la résistance des souches animales à cet association était faible (<8%). Néanmoins, les taux enregistrés diffèrent d'une étude à une autre (BOUNAR-KECHIH *et al.*, 2018 ; PAPADOPOULOS *et al.*, 2019).

A propos de taux de multirésistance enregistré (~ 21%), nos résultats ne rejoignent pas ceux de plusieurs auteurs (AL ASHMAWY *et al.*, 2016 ; CHAALAL *et al.*, 2018 ; TITOUCHE *et al.*, 2020).

Dans cette étude, la fréquence d'isolement de souches SARM semble moins importante que celle annoncée par CHAALAL *et al.* (2018), qui ont rapporté un taux de 21,56% dans divers types d'aliments, y compris le lait cru, la viande et la pâtisserie. Des prévalences faibles ont été observées dans d'autres études menées en Algérie, avec un taux de 4,81% dans le lait cru et les produits laitiers traditionnels (TITOUCHE *et al.*, 2020) et 13,6% (MAIRI *et al.*, 2019). Cependant, des SARM ont également été isolés dans la viande (DE BOER *et al.*, 2009 ; HANSON *et al.*, 2011 ; TANG *et al.*, 2017 ; THAPALIYA *et al.*, 2017) et dans des produits prêts à manger (WANG *et al.*, 2017 ; ISLAM *et al.*, 2019). Beaucoup d'études menées à travers le monde montrent l'invasion des souches SARM dans les denrées alimentaires. Ceci, pourrait être lié aux transmissions entre l'animal, l'homme et les matrices alimentaires.

Des voies de transfert des SARM ont été décrites, incluant le contact direct avec les animaux, qui sont des porteurs potentiels de ces souches, la contamination environnementale et la consommation ou la manipulation de denrées alimentaires contaminées (PETINAKI et SPILIOPOULOU, 2012).

À ce jour, un grand nombre d'études ont rapporté l'isolement de SARM à partir de bétail, d'animaux sauvages et d'aliments dérivés, ainsi que de professionnels travaillant dans l'élevage ou ceux impliqués dans la chaîne de production alimentaire (SERGELIDIS et ANGELIDIS, 2017). Des rapports récents de Belgique indiquent que le SARM était impliqué dans le portage nasal des bovins dans 19,8% des élevages et responsable de la mammite bovine dans 10 % des élevages belges (NEMEGHAIRE *et al.*, 2014). Une étude en Chine a rapporté que 15,5 % des isolats de mammite bovine étaient des souches de SARM et 38,2 % des souches de SARM avaient observé une résistance à plus de 8 classes d'antibiotiques (WANG *et al.*, 2015). En Algérie, une fréquence de 5,4% de SARM a déjà été isolés à partir de bétail (MAIRI *et al.*, 2019). Ainsi, on pense que la production primaire de volaille est un réservoir potentiel d'infections d'origine alimentaire à SARM, deux études de prévalence sur le SARM dans la filière avicole en Algérie sont disponibles. BENRABIA *et al.* (2020) et BOUNAR-KECHIH *et al.* (2018) ont constaté que 76 % et 12% des poulets de chair étaient porteurs de *S. aureus*, respectivement, et que 27,5% et 53% des isolats respectivement étaient des SARM.

Une attention particulière doit être portée à nos souches SARM isolées. En effet, ces dernières résistent vis-à-vis d'autres antibiotiques, en plus de de leurs résistances vis-à-vis les

β -lactamines, à savoir les tétracyclines, les aminosides (néomycine et gentamicine), les phénicolés (chloramphénicol), les macrolides (érythromycine) et les fluoroquinolones (ofloxacines), ce qui est en accord avec les résultats de certains auteurs (PARISI *et al.*, 2016 ; CARUSO *et al.*, 2016). Selon PARISI *et al* (2016), les souches SARM multirésistantes pose un problème de prise en charge efficiente en retardant l'éradication des infections à SARM.

Formation de biofilm chez *S. aureus*

La culture sur milieu rouge Congo a révélé que 117 souches sur 177 sont productrices de slime, dont les isolats d'origine alimentaire sont plus producteurs de slime (80%) que les isolats d'origine animale (54.64%). Notre résultat est nettement inférieur à ce qui a été rapporté par ACHEK *et al* (2020), qui ont détecté un taux de 100% pour des isolats provenant d'aliments. GUNDOGAN *et al* (2006) ont constaté que 58 (52,7 %) des souches de *S. aureus* isolées à partir de lait cru, lait pasteurisé et des glaces ont été productrice du Slime. VASUDEVAN *et al* (2003) ont signalé que 32 souches de *S. aureus* (91,4 %) isolées de mammites bovines ont été productrices de Slime, ces valeurs sont plus élevées par rapport à nos résultats.

D'après les résultats des tests TCP, cent-six souches (59,89%) peuvent être considérées comme de fortes formatrices de biofilm, nos résultats se rapprochent de ceux de GAJEWSKA et CHAJECKA-WIERZCHOWSKA (2020). Les fréquences obtenues concernant le nombre de souches faiblement ou moyennement formatrices de biofilms ne sont pas en accord avec celles de plusieurs auteurs, qui ont obtenu des valeurs variables d'une étude à une autre (RODRIGUEZ-LAZARO *et al.*, 2018 ; ACHEK *et al.*, 2020 ; KOU *et al.*, 2021).

Le slime est défini comme la substance polymérique extracellulaire, également connu sous le nom des exo-polysaccharides (EPS), qui est principalement formé par PIA chez *S. aureus* (COSTERTON *et al.*, 1995). L'opéron *ica*, qui code pour le PIA, est considéré par de nombreux chercheurs comme un marqueur de la pathogénicité de la souche du genre *Staphylococcus*. Cependant, d'autres chercheurs ont trouvé la présence de ces protéines dans certains *Staphylocoque* qui ne sont pas capables de former un biofilm (RACHMAWATI et ALIMARDJONO, 2019). En effet, le gène *icaD* était présent dans tous les isolats de *S. aureus*, ce qui n'était pas corrélé avec les résultats obtenus par la méthode phénotypique, concernant la capacité de ces souches à former le biofilm (GAJEWSKA et CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, 2020). De ce fait, il a été rapporté que la corrélation entre le portage de l'*ica* et la capacité de formation de biofilm chez *S. aureus* est imprévisible (O'NEILL *et al.*, 2007), car l'expression des gènes codant le biofilm et l'adhésion des cellules bactériennes sur les surfaces est un processus complexe de régulation génique lié à plusieurs facteurs incluant

la présence de nutriments, le pH et les caractéristiques de la surface (ABDALLAH *et al.*, 2014 ; STEWART *et al.*, 2015 ; OTTO, 2018).

Selon plusieurs auteurs, la méthode de rouge Congo semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm *in vitro*. La détection du biofilm par la méthode TCP semble plus fiable que celle du rouge congo (MATHUR *et al.*, 2006 ; BELLIFA *et al.*, 2013).

Il a été suggéré que chez nombreuses espèces bactériennes la sensibilité aux antimicrobiens pourrait être liée à la production de biofilm (BARAKAT et NABIL, 2016 ; VUOTTO *et al.*, 2017). En revanche, la relation exacte entre eux reste encore confuse. Pour *S. aureus*, plusieurs études ont suggéré que les souches formant un biofilm étaient plus multirésistantes et que les SARM produisaient un biofilm plus fort que les souches SASM (CHA *et al.*, 2013 ; YANG *et al.*, 2017). Cependant, dans cette étude, certaines souches fortement formatrices de biofilm quel que soit leur origine ont été sensible vis-à-vis de toutes les molécules d'antibiotique, tandis que trois souche faiblement formatrice d'origine animale ont été multirésistantes. Ainsi, une souche SARM d'origine animale a été qualifiée de faible formatrice et six autres d'origine alimentaire ont une formation modérée. Ce qui suggère qu'une souche avec une forte capacité de production de biofilm peut ne pas toujours montrer une résistance plus sévère et vice versa.

Staphylococcus aureus est capable d'abriter une pléthore de facteurs de virulence. Cela, inclut la superfamille des entérotoxines staphylococciques (ES), des facteurs de virulence sécrétés qui partagent des similitudes fonctionnelles et structurelles (FISHER *et al.*, 2018). Il existe de nombreux ES incluant *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sep* et *ser* (FISHER *et al.*, 2018). Le taux de détection des gènes d'entérotoxine (*sea-ser*) dans les 98 isolats de *S. aureus* était de 50%. Etant donné que des souches incluant celles fortement formatrices de biofilm ne contiennent aucun gène d'entérotoxine, de plus, la souche animale faiblement formatrice de biofilm avait refermé les mêmes gènes tels que quatre souches fortes formatrices à l'exception du gène *sec*.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Vivant entre le commensalisme et la pathogénicité, *S. aureus* est bien désigné comme un agent pathogène clinique et épidémiologique. Il a été démontré que le rôle de *S. aureus* comme un pathogène d'origine alimentaire et animale ne doit pas être négligé.

L'étude de la résistance des isolats d'origine animale et alimentaire (n=177) vis-à-vis de quelques molécules d'antibiotiques, utilisées en médecine humaine et vétérinaire, a montré l'existence de résistance avec des proportions variables selon les différentes familles considérées. Dix-neuf souches SARM ont été isolées soit une prévalence de 10,73%.

Ce travail a mis en évidence l'existence de souches de *S. aureus* multirésistantes à divers antibiotiques largement utilisés en antibiothérapie. Cet usage exerce probablement une pression de sélection qui induit l'apparition des résistances multiples additionnelles.

En ce qui concerne la capacité des souches à former les biofilms *in vitro*, les résultats obtenus à l'issue de la méthode RCA révèlent que 80% des souches sont productrices de slime après 48 heures d'incubation sur RCA. Par ailleurs, toutes les souches sont révélées formatrices de biofilm selon la méthode TCP.

Les résultats de nos expériences ont montré que la méthode des microplaques était la plus efficace et la mieux adaptée pour une évaluation quantitative de l'adhésion bactérienne sur une surface.

L'éradication d'un biofilm bactérien pose de gros problèmes cliniques, car l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctonique se révèle bien souvent moins efficace sur des structures organisées en biofilm. Il devient pourtant essentiel d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm, afin de trouver de nouveaux moyens de prévention et de traitement des infections associées aux biofilms. Les approches expérimentales classiques pour étudier les bactéries d'intérêt médical doivent être adaptées à l'étude de leur mode de vie complexe en biofilms.

La dissémination progressive de l'antibiorésistance doit être considérée comme une menace majeure pour l'homme, en absence d'une politique claire et restrictive visant à réduire l'usage des agents antimicrobiens non seulement chez l'homme, mais aussi chez l'animal. Aujourd'hui, plus que jamais, la prévention de la contamination des denrées alimentaires par *S. aureus* repose sur l'instauration de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication, sur l'application de règles dictées par le système HACCP et le contrôle de toutes les procédures post-production.

Notre étude ouvre plusieurs perspectives telles :

- L'étude d'épidémiologie moléculaire afin de comprendre et de contrôler la diffusion et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et pour savoir la clonalité des souches impliquées dans les infections à SARM.
- L'isolement de souches de *S. aureus* à partir des autres matrices alimentaires et leur caractérisation sur le plan phénotypique et génotypique.
- La comparaison entre les souches d'origine alimentaire, animale et hospitalière (notamment les souches SARM).
- La recherche par des techniques de biologie moléculaires les gènes responsables de la formation de biofilm.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdallah, F.B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., Bakhrouf, A. 2009. Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Brazilian Journal of Microbiology. 40(2), 394-398.

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N.E. 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. Archives of Microbiology. 196, 453-472.

Abraham, N. M., Jefferson, K. K. 2012. *Staphylococcus aureus* clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. Microbiology (Reading). 158, 1504-1512.

Abraham, W. R. 2006. Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria. Current Medicinal Chemistry. 13, 1509-1524.

Accarias, S. 2014. Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Ecole doctorale : SEVAB, Sciences Economiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries. Université de Toulouse, France, 212p.

Acharya, T. 2013. Teichoic Acid/Lipoteichoic acid: Characteristics and Medical Importance. Microbe Online.

Achek, R., Hotzel, H., Cantekin, Z., Nabi, I., Hamdi, TM., Neubauer, H., El-Adawy, H. 2018. Emerging of antimicrobial resistance in *Staphylococci* isolated from clinical and food samples in Algeria. BMC Research Notes. 11(1), 663.

Achek, R., Hotzel, H., Nabi, I., Kechida, S., Mami, D., Didouh, N., Tomaso, H., Neubauer, H., Ehricht, R., Monecke, S., El-Adawy, H. 2020. Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Sources in Algeria. Pathogens. 9(2), 153.

Ahmer, B.M.M. 2004. Cell-to cell signaling in *Eschericia coli* and *Salmonella enterica*. Molecular Microbiology. 52, 933-945.

Akkou, M., Antri, K., Bachtarzi, MA., Bes, M., Tristan, A., Dauwalder, O., Kaidi, R., Meugnier, H., Tazir, M., Etienne, J., Laurent, F., Ramdani-Bouguessa, N. 2016. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals in Algeria. Pakistan Veterinary Journal. 36(2), 184-188.

Akiyama, H., Hamada, T., Huh, W-K., Yamasaki, O., Oono, T., Fujimoto, W., Iwatsuki,

- K. 2003.** Confocal laser scanning microscopic observation of glycocalyx production by *Staphylococcus aureus* in skin lesions of bullous impetigo, atopic dermatitis and pemphigus foliaceus. *British Journal of Dermatology*. 148(3), 526-532.
- Al-Ashmawy, M.A., Sallam, K.I., Abd-Elghany, S.M., Elhadidy, M., Tamura, T. 2016.** Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products. *Foodborne Pathogens Disease*. 13, 156-162.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B. 2007.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128, 1037-1050.
- Alhede, M., Qvortrup, K., Liebrechts, R., Høiby, N., Givskov, M., Bjarnsholt, T. 2012.** Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 65, 335-42.
- Allakhverdiev., Kerim, R., Lovera, D., Altstäedt, V., Schreier, P., Kador, L. 2009.** Confocal Raman microscopy: Non destructive materials analysis with micrometer resolution. *Reviews on Advanced Materials Science*. 20, 77-84.
- Alnasouri, M. 2010.** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Ananthanarayan, P. 2006.** Textbook of Microbiology. 7ème édition, Inde, 665p.
- Angandza, G.S. 2012.** Recherche des souches de *Staphylococcus aureus* et *pseudintermedius* résistant à la méticilline dans les muqueuses anale et nasale de chiens consultés dans les cabinets vétérinaires de Dakar (Sénégal). Diplôme d'état. Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires. Université cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, 104p.
- Asahi, Y., Miura, J., Tsuda, T., Kuwabata, S., Tsunashima, K., Noiri, Y., Sakata, T., Ebisu, S., Hayashi, M. 2015.** Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express*. 5(1), 6.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. 2003.** An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*. 130, 33-40.
- Asghari, E., Kiel, A., Kaltschmidt, B.P., Wortmann, M., Schmidt, N., Hüsgen, B., Hütten, A., Knabbe, C., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B. 2021.** Identification of Microorganisms from Several Surfaces by MALDI-TOF MS: *P. aeruginosa* Is Leading in Biofilm Formation. *Microorganisms*. 9, 992.
- Assous, M-V., Basse-Guérimeau, A-L., Bourhy, H., Dhote, R., Paugam, A. 1999.**

Microbiologie et pathologie infectieuse. 2ème édition. Paris : De Bœck et Larcier, 973pp.

Aumeran, C., Balestrino, D., Forestier, C. 2020. Biofilms bactériens et santé, Encyclopédie de l'Environnement.

Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. 2003. Bactériologie clinique. 3ème édition. Ellipses, Paris.

Avril, J.L., Denis, F., Monteil, H. 2000. Bactériologie clinique. 3ème édition. Paris : Ellipses, 602pp.

Avril, J.L., Fauchère, J.L. 2002. Bactériologie générale et médicale. *Ellipses*.

Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Bonaventura, G.D., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C. 2016. Critical review on biofilm methods, *Critical Reviews in Microbiology*. 43(3), 313-351.

B

Bamgbola, O. 2016. Review of vancomycin-induced renal toxicity: an update. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 07(3), 136-147.

Barakat, G.I., Nabil, Y.M. 2016. Correlation of mupirocin resistance with biofilm production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from surgical site infections in a tertiary centre, Egypt. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 4, 16-20.

Barrett, L., Atkins, B. 2014. The clinical presentation of prosthetic joint infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(1), i25–i27.

Barzic, A.T., Ioan, S. 2015. Antimicrobial drugs from basic concepts to complex therapeutic mechanism of polymer systems. Edition Concepts Compounds and the Alternatives of Antibacterials.

Behlou, I., Gilmore, M.S. 2008. Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases. *Archives of Ophthalmology*. 126, 1572-1581.

Beleneva, I.A. 2011. Incidence and characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* from the Japan and South China seas. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 382-387.

Bellifa, S. 2014. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella Pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Bellifa, S., Hassaine, H., M'hamedi, I., Kara Terki, I., Lachachi, M., Didi, W. 2013. Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical

devices at the university hospital of Tlemcen. 4th International Woekschop on Biotechnology. Tlemcen. Algeria.

Beloin, C., Roux, A., Svanborg, C. 2005. *Echerichia coli*, biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology. 322, 249-289.

Benrabia, I., Hamdi, T.M., Shehata, A.A., Neubauer, H., Wareth, G. 2020. Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in Poultry Species in Algeria: Long-Term Study on Prevalence and Antimicrobial Resistance. Veterinary Sciences. 7(2), 54.

Bhatia, A., Zahoor, S. 2007. *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 3, 188-197.

Bhattacharya, M., Wozniak, D.J., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. 2015. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. Expert Review of Anti-infective Therapy. 13, 1499-1516.

Biljana M, S., Dinic, M., Orlovic, J., Babic, T. 2015. *Staphylococcus aureus*: immunopathogenesis and human immunity. Acta Facultatis Medicae Naissensis. 32(4), 243-257.

Bismuth, R., Leclercq, R. 2000. *Staphylococcus aureus* et antibiotiques, in Précis de Bactériologie clinique. Editeur ESKA, 611-616.

Bjorklof, K., Nurmiäho-Lassila, E.L., Klinger, N., Haahtela, K., Romantschuk, M. 2000. Colonization strategies and conjugal gene transfer of inoculated *Pseudomonas syringae* on the leaf surface. Journal of Applied Microbiology. 89, 423-432.

Boisset, S., Vandenesch, F. 2010. Les Facteurs de Virulence Autres que les Entérotoxines, in « *Staphylococcus aureus* », Tec et Doc, Paris.

Bokarewa, M.I., Jin, T., Tarkowski, A. 2006. *Staphylococcus aureus* : Staphylokinase. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 38(4), 504-509.

Boles, B.R., Horswill, A.R. 2008. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. PLoS Pathog. 4, e1000052,

Boneca, I.G., Chiosis, G. 2003. Vancomycin Resistance : Occurrence, Mechanisms and Strategies to Combat it. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 7(3), 311-328.

Bosgiraud, C. 2003. Microbiologie général et santé, association des enseignants de microbiologie et d'immunologie des facultés de pharmacie, édition ESKA. 277-292.

Boumar-Kechih, S., Taha Hamdi, M., Aggad, H., Meguenni, N., Cantekin, Z. 2018. Carriage methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in poultry and cattle in northern Algeria. Veterinary Medicine International. 2018, 4636121.

Boutaleb, N. 2007. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux

couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud UFR science et science de l'ingénieur. 194 p.

Branger, A., Richer, M.M., Roustel, S. 2007. Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon,131-164.

Breyers, J.D., Ratner, J.P. 2004. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. ASM News. 70, 232-237.

Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. Biofouling. 27, 1017-1032.

Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R. 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. Journal of Microbiological Methods. 82(1), 64-70.

Brown, K. 2004. Penicillin man: Alexander Fleming and the antibiotic revolution. Stroud, Gloucestershire: Sutton Pub.

Brown, S., Santa Maria, J.P.Jr., Walker, S. 2013. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. Annual Review of Microbiology. 67(1), 313-336.

Bruellhoff, K., Fiedler, J., Möller, M., Groll, J., Brenner, R, E. 2010. Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. International Journal of Artificial Organs. 33, 646-53.

Buckingham, S.C., McDougal, L.K., Cathey, L.D. 2004. Emergence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. Pediatric Infectious Disease Journal. 23, 619-624.

C

Callon, C., Gilbert, F.B., Cremoux, R.D., Montel, MC. 2007. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. Food Control. 19, 143-150.

Carle, S. 2009. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Pharmactuel. 42(2).

Caruba, T., Accoulet, E. 2015. Pharmacologie et thérapeutique, 2ème édition, Elsevier masson.

Castro, A., Santos, C., Meireles, H., Silva, J., Teixeira, P. 2016. Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. Journal of Infection and Public Health. 9, 153-160.

Cavacol, M., Hasman, H., Xia, S., Aarestrup, F.M. 2009. qnrD, a novel gene conferring

transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* sérovar *Kentucky* and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 603-608.

Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., Buret, A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 1771-1776.

Cha, J.O., Yoo, J.I., Yoo, J.S., Chung, H.S., Park, S.H., Kim, H.S., et al. 2013. Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 4(5), 225-232.

Chaalal, W., Chaalal, N., Bourafa, N., Kihal, M., Diene, S.M., Rolain, J.M. 2018. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from food products in Western Algeria. *Foodborne Pathogens and Disease*. 15, 353-360.

Chaieb, K., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. 2005. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infection*. 61(3), 225-230.

Chalvet de Rochemonteix, A. 2009. Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.

Chambers, H.F. 2009. « Antimicrobial Resistance and Therapy of *Staphylococcus aureus* Infection », in : « *Staphylococcus aureus* : Molecular and Clinical Aspect », Horwood Publishing, Chichester.

Chatterjee, S., Maiti, P., Dey, R., Kundu, A., Dey, R. 2014. Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. *Annals of Medical and Health Science Research*. 4, 100-104.

Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J-I., Herrmann, M., Preissner, K.T. 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature Medicine*. 8 (7), 687-693.

Chaussade, H., Sunder, S., Bernard, L., Coloby, P., Guy, L., Karsenty, G., Bastide, C., Bruyère, F. 2013. Les médicaments antibiotiques en urologie. *Progrès en Urologie*. 23(15), 1327-1341.

Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., Herrmann, M. 2005. *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial 'secretable expanded repertoire adhesive molecules' (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thrombosis Haemostasis*.

94 (2), 278-285.

Chen, Q., Xie, S., Lou, X., Cheng, S., Liu, X., Zheng, W., Zheng, Z., Wang, H. 2020. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *MicrobiologyOpen*. 9, e00946.

Chen, S., Yu, K., Ling, Q., Huang, C., Zheng, J., Cheng, Q., Zhu, M., Li, N., Chen, M. 2014. One Case about the Diagnosis and Treatment of Right-Sided Infective Endocarditis without Any Inducement. *Case Reports in Clinical Medicine*. 3, 631-635.

Chen, Y., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., Norde, W. 2011. Statistical analysis of long- and short-range forces involved in bacterial adhesion to substratum surfaces as measured using atomic force microscopy. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 77, 5065-70.

Chopra, I., Roberts, M. 2001. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65 (2), 232-260.

Christopher, M-W., Bassler, B. 2007. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21, 319-46.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100. CLSI, Wayne, PA, USA.

Coester, S., Cloete, T. 2005. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Critical Reviews in Microbiology*. 31, 213-232.

Collomb, A. 2011. Caractérisation de la différence de sensibilité à l'infection par *Staphylococcus aureus* de deux lignées de souris. Thèse de doctorat. Université Paul-Bâtier de Toulouse. France.

Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H., Taylor, D.E. 2003. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 (12), 3675-3681.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49, 711-745.

Courvalin, P., Leclercq, R. 2012. AntibioGramme, 3ème édition, ESKA, Paris.

Courvalin, P., Leclercq, R., Bingen, E. 2006. AntibioGramme, ESKA, Paris.

Couture, B. 1990. Bactériologie médicale «Étude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris, 15-32.

Craft, K.M., Nguyen, J.M., Berg, L.J., Townsend, S.D. 2019. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype.

Medchemcomm. 10(8), 1231-1241.

Cristino, J.M. 1999. Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 12, 199-202.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., Penadés, J.R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*. 183(9), 2888–2896.

D

Daurel, C., Leclercq, R. 2008. L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*. 407, 81-90.

Davey, M.E., O'Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 847-867.

Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2(2), 114-122.

Davis, S.C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W.H., Mertz, P.M. 2008. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair and Regeneration*. 16(1), 23-29.

De Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J.T., Wit, B., Huijsdens, X.W., de Neeling, A.J., Bosch, T., van Oosterom, R.A., Vila, A., Heuvelink, A.E. 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*. 134(1-2), 52-56.

De Buyser, M.L., Hennekinne, J.A. 2010. « Culture en Laboratoire, Méthodes d'Isolément et Détection », in « *Staphylococcus aureus* », Tec et Doc, Paris.

De Buyser, M.L., Surat, L. 2005. « *Staphylococcus aureus* », In : « Bactériologie Alimentaire : Compendium d'Hygiène des Aliments », 2^{ème} édition, Éditeur Economica, Paris.

De Carvalho, C., Da Fonseca, M. 2007. Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. *Biotechniques*. 42, 616-620.

Delarras, C. 2007. « Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire ». Tec et Doc, Lavoisier. Paris.

DeLeo, P.C., Baveye, P., Ghiorse W.C. 1997. Use of confocal laser scanning microscopy on soil thin-sections for improved characterization of microbial growth in unconsolidated soils and aquifer materials. *Journal of Microbiological Methods*. 30(3),193-203.

Denis, F., Poly, M.C., Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. 2007. Bactériologie médicale:

techniques usuelles. Edition Elsevier Masson, 27.

Deverriere, B. 2007. Reproduction expérimentale de mammites à *Staphylococcus aureus* chez la brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires. Thèse de doctorat en sciences vétérinaires. L'Université Paul- Sabatier de Toulouse, France.

DeVita, M.D., Wadhwa, R.K., Theis, M.L., Ingham, S.C. 2008. Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. *Journal of Foodservice*. 18, 76-79.

Di Domenico, E.G., Toma, L., Provot, C., Ascenzioni, F., Sperduti, I., Prignano, G., Gallo, M.T., Pimpinelli, F., Bordignon, V., Bernardi, T., Ensoli, F. 2016. Development of an *in vitro* Assay, Based on the BioFilm Ring Test®, for Rapid Profiling of Biofilm-Growing Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 7.

Dige, I., Nilsson, H., Kilian, M., Nyvad, B. 2007. *In situ* identification of *Streptococci* and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence *in situ* hybridization. *European Journal Of Oral Sciences*. 115, 459-67.

Djeribi, R., Bouchloukh, W., Jouenne, T., Mena, B. 2012. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *American Journal of Infection Control*. 40(9), 854-9.

Dohnalkova, A.C., Marshall, M.J., Arey, B.W., Williams, K.H., Buck, E.C., Fredrickson, J.K. 2011. Imaging Hydrated Microbial Extracellular Polymers: Comparative Analysis by Electron Microscopy. *Applied and environmental microbiology*. 77, 1254-1262.

Donio, P.Y. 2010. Sensibilité de la bactérie aux agents bactériostatiques ou bactéricides, *Staphylococcus aureus*. Monographie de Microbiologie, Edition Tec&Doc.

Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Centers for Disease Control and Prevention. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9), 881-890.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 15 (2), 167-193.

Drago, L., Toscano, M. 2017. Biofilm Formation and the Biological Response, Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs), 25-39.

Dubas, M. 2008. Virulence de *Staphylococcus aureus* et des *Listeria*, Association des anciens élèves de l'institut Pasteur, 50^{ème} année, numéro 195.

Dubois-Brissonnet, F., Briandet, R., Bellon-Fontaine, M.N. 2006. Agents chimiques ou naturels: des outils de maîtrise de la contamination microbiologique des surfaces. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, Académie vétérinaire de France*, 2006, pp.161.

Dumas, C. 2007. Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de

Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse, 306 p.

Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.E., Tristan, A., Vandenesch, F. 2010. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. *Medecine Science (Paris)*. 26, 943-949.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schkeufer, K.H., Stackebrandt, E. 2006. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd.;Springer, New-York, Vol 4, Chap.1.2.1. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, 4-75.

E

EFSA. 2014. Report for 2012 on the results from the monitoring of veterinary medicinal products residues and other substances in live and animal products. EFSA supporting publication, 540, 65.

El-anzi, O. 2014. Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées au centre hospitalier ibn sina de rabat. Thèse de doctorat. Faculté de médecine et de pharmacie–Rabat. Université Mohammed V– Souissi, Maroc, 146p.

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

F

Fauchere, J.L., Avril, J.L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris. 213217.

Faye, K. 2005. Le point sur l'usage vétérinaire des antibiotiques: impact sur l'antibiorésistance des bactéries en santé animale et humaine. Masson, Paris. 7, 45-52.

Ferreira, C., Pereira, A.M., Melo, L.F. 2010. Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Applied Microbiology*, 845-854.

Ferron, A. 1984. Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12ème édition. Crouan et Roques, Paris. 87-94.

Feuillie, C., Formosa-Dague, C., Hays, L.M.C., Vervaeck, O., Derclaye, S., Brennan, M.P., Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Dufrêne, Y.F. 2017. Molecular interactions and inhibition of the staphylococcal biofilm-forming protein SdrC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(14), 3738-3743.

Flandrois, J-P., Courcol, R., Lemeland, J-F., Ramuz, M., Sirot, J., Soussy, C-J., Flandrois, C., Carret, G., de Montclos, M., Chomar, M. 2000. Bactériologie médicale. Lyon: pul, 309pp.

Flemming, H-C. 2008. Why Microorganisms Live in Biofilms and the Problem of

Biofouling. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Flemming, H.C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8, 623–633.

Flemming, H-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14, 563-575.

Fisher, E.L., Otto, M., Cheung, G.Y.C. 2018. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in Microbiology*. 9, 436.

Folkesson, A., Haagensen, J.A.J., Zampaloni, C., Sternberg, C., Molin, S. 2008. Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides. *Public Library of Science*. 3(4), 1-11.

Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*. 12(1), 49-62.

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

Foster, T.J., McDevitt, D. 1994. Surface-associated proteins of *S. aureus* : their possible roles in virulence. *Journal FEMS Microbiology Letters*. 118, 199-205.

Foster, T.J., Peters, G., Kehrel, B.E., Herrmann, M. 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*. 96, 2149-2156.

Freeman, C.L., Freeman, C.K. 2006. *Staphylococcus aureus* infections. 2eme édition. Philadelphia: Chelsea House Publishers. 26-41.

Freney, J. 2007. Précis de bactériologie clinique. Paris: Éd. Eska.

Freney, J., Kloos, W., Hajek, V., Webster, J., Bes, M., Brun, Y., Vernozy Rozand, C. 1999. Recommended minimal standers for description of new Staphylococcal species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 489-502.

G

Gabi, M., Hefermehl, L., Lukic, D., Zahn, R., Vörös, J., Eberli, D. 2011. Electrical microcurrent to prevent conditioning film and bacterial adhesion to urological stents. *Urological Research*. 39(2), 81-8.

Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W. 2020. Biofilm Formation Ability and Presence of Adhesion Genes among Coagulase-Negative and Coagulase-Positive *Staphylococci* Isolates from Raw Cow's Milk. *Pathogens*. 9(8), 654.

Gardete, S., Tomasz, A. 2014. Mechanisms of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus*

aureus. The Journal of Clinical Investigation. 124(7), 2836-2840.

Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. 2008. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. Progress in Natural Science. 18(9), 1049-56.

Garrity, G.M., Lilburn, T.G., Cole, J.R., Harrison, S.H. Euzéby, J., Tindall, B.J. 2007. Taxonomic outline of bacteria and archaea release 7.7 Part 9- The bacteria: Phylum "Firmicutes" Class "Bacilli" »

Gaudy, C., Buxeraud, J. 2005. Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique, ELSEVIER CAMPUS MEDECINE, 15-20.

Ghigo, J.M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature. 412, 442-445.

Goller, C.C., Romeo, T. 2008. Environmental influences on biofilm development. Current Topics in Microbiology and Immunology. 322, 37-66.

Gordon, R.J., Lowy, F.D. 2008. Pathogenesis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clinical Infectious Diseases, 46, 350-359.

Grundmann, H., Aires de Sousa, M., Boyce, J., Tiemersma, E. 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. Lancet. 368, 874-885.

Guardabassi, L., Courvalin, P. 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In : Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington, 1-18.

Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., Briandet, R. 2015. Exploring the Diversity of *Listeria Monocytogenes* Biofilm Architecture by High-Throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the Predominance of the Honeycomb-Like Morphotype. Applied and Environmental Microbiology Journal. 81(5) , 1813-9.

Guiraud, J.P., Rosec, J.P. 2004. Pratiques des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR.

Gundogan, N., Citak, S., Turan, E. 2006. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. Food Control. 17, 389-392.

H

Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A., Flock, J.I. 2003. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. Infection and Immunity Journal. 71(5), 2310-2317.

- Hanson, B.M., Dressler, A.E., Harper, A.L., Scheibel, R.P., Wardyn, S.E., Roberts, L.K., Kroeger, J.S., Smith, T.C. 2011.** Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health*. 4(4), 169-174.
- Hamadi, F., Latrache, H., El Ghmari, A., Ellouali, M., Mabrouki, M., Kouider, N. 2004.** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*. 54, 213-225.
- Haras, D. 2005.** Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*. 93, 27-41.
- Harriott, M.M., Noverr, M.C. 2011.** Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in Microbiology*. 19(11), 557-63.
- Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., O'Seaghdha, M., van Schooten, C.J., Kerrigan, S.W., Emsley, J., Silverman, G.J., Cox, D., Lenting, P.J., Foster, T.J. 2006.** *Staphylococcus aureus* protein A binding to Von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS Journal*. 273, 4831-4841.
- Hassen, U., Hussain, M., Villone, D., Herrmann, M., Robenek, H., Peters, G., Sinha, B., Bruckner, P. 2006.** The anchorless adhesion Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biology*. 25 (4), 252-260.
- Hazan Z., Zumeris, J., Jacob, H., Raskin, H., Kratysh, G., Vishnia, M., Dror, N., Barliya, T., Mandel, M., Lavie, G. 2006.** Effective Prevention of Microbial Biofilm Formation on Medical Devices by Low-Energy Surface Acoustic Waves. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 50, 4144-4152.
- Hennekine, J.A., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, M.L. 2003.** Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *Journal of Applied Microbiology*. 94, 321-329.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S. (2000).** Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology (Reading)*. 146(10), 2395-2407.
- Hill, L.R. 1981.** Taxonomy of the staphylococci. The staphylococci. Aberdeen University Press.
- Hiramatsu, K. 2001.** Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* : a New Model of

Antibiotic Resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 147-155.

Hobson, C., Chan, A.N., Wright, G.D. 2021. The Antibiotic Resistome: A Guide for the Discovery of Natural Products as Antimicrobial Agents. *Chemical reviews*.

Høiby, N. 2017. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 125, 272-275.

Hori, K., Matsumoto, S. 2010. Bacterial adhesion : from mechanism to control. *Biochemical engineering journal*. 48, 424-434.

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7), 2982-2992.

Hosein, A.S.M., Motamedifar, M., Hadi, N., Sedigh, E.S.H. 2014. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 7(6), e10741.

Hou, W., Sun, X., Wang, Z. et al., 2012. Investigative Ophthalmology& Visual Science. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 9, 5624-5631.

Houry, A., Briandet, R., Aymerich1, S., Gohar, M. 2010. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation *Microbiology (Reading)*. 156, 1009-1018.

Houston, P., Rowe, S.E., Pozzi, C., Waters, E.M., O’Gara, J.P. 2011. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infection and Immunity*. 79, 1153-1165.

Huang, Z., Meric, G., Liu, Z., Ma, R., Tang, Z., Lejeune, P. 2008. luxS-Based Quorum-Sensing Signaling Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 17(1), 12–19.

I

Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 71, 2793-2795.

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

Islam, M.A., Parveen, S., Rahman, M., Huq, M., Nabi, A., Khan.Z.U.M., Ahmed, N., Wagenaar, J.A. 2019. Occurrence and characterization of methicillin resistant

Staphylococcus aureus in processed raw foods and ready-to-eat foods in an urban setting of a developing country. *Frontiers in Microbiology*. 10, 503.

J

Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, M.L., Shitliff, M.E. 2008. Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 21, 26-59.

Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, M.L., Shitliff, M.E. 2008. Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 21, 26-59.

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

Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B., Ismail, S., Dadrasnia, A. 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control*. 54, 383-388.

Joffin, C., Joffin, J.N. 2010. *Microbiologie Alimentaire, Scérén, CRDP Aquitaine.*

Johnson, A.P. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(4), iv43-iv43.

Jonsson, K., Signas, C., Muller, H.P., Lindberg, M. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *European Journal of Biochemistry*. 202, 1041-1048.

K

Kaiser, G.E. 2017. TSA Plate Culture of the Chromogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*.

Kampf, G., Adena, S., Rüdén, H., Weist, K. 2003. Inducibility and potential role of MecA gene positive oxacillin susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *Journal of Hospital Infection*. 54, 124-129.

Kaplan, J.B. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*. 89(3), 205-218.

Kaplan, J.B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D.H., Ramasubbu, N. 2004. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(7), 2633-2636.

Karatan, E., Watnick, P. 2009. Signals Regulatory Networks and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73, 310-347.

Kara-Terki, I. 2014. Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de

Staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

Kasten, M.J. 1999. Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol. Mayo Clinic Proceedings. 74, 825-33.

Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria material interactions. European Cells and Materials Journal. 8, 37-57.

Kiedrowski, M.R., Kavanaugh, J.S., Malone, C.L., Mootz, J.M., Voyich, J.M., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W., Horswill, A.R. 2011. Nuclease Modulates Biofilm Formation in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. PLOS ONE. 6, e26714,

Kim, H.K., Missiakas, D., Schneewind, O. 2014. Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*. Journal of Immunological Methods. 84, 577-601.

Kirmusaoglu, S. 2016. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. In Microbial Biofilms-Importance and Application, IntechOpen, Vienna, Austria. 189-209.

Kirmusaoglu, S. 2019. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. In Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods, IntechOpen, London, UK.

Klein, G. 2011. Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale, Bretagne.

Klinger, C., Filloux, A., Lazdunski, A. 2005. Les biofilms, forteresses bactériennes. La recherche. 389, 42-46.

Kluytmans, J.A.J.W. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency. Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16, 11-15.

Knox, J., Uhlemann, A.C., Lowy, F.D. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. Trends in Microbiology. 23(7), 437-44.

Kobayashi, S.D., Malachowa, N., DeLeo, F.R. 2015. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. American Journal of Pathology. 185(6), 1518-1527.

Köckritz-Blickwede, M.V. 2009. A Pathogen's Swiss Army Knife. American Society for Microbiology.

Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N., Mahadik, K.R. 2009. Biofilm: Importance and applications. Indian Journal of Biotechnology. 8, 159-168.

- Kong, C., Chee, C.F., Richter, K., Thomas, N., Abd Rahman, N., Nathan, S. 2018.** Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative. *Scientific reports*. 8(1), 2758.
- Kou, X., Cai, H., Huang, S., Ni, Y., Luo, B., Qian, H., Ji, H., Wang, X. 2021.** Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Raw Milk in Northern Xinjiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 705947.
- Kranjec, C., Morales Angeles, D., Torrissen Mårli, M., Fernández, L., García, P., Kjos, M., Diep, D.B. 2021.** Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiotics*. 10(2), 131.
- Kranjec, C., Morales Angeles, D., Torrissen Mårli, M., Fernández, L., García, P., Kjos, M., Diep, D.B. 2021.** Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiotics*. 10(2), 131.
- Kuchma, S.L., Connolly, J.P., O'toole, G.A. 2005.** A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 187(4), 1441-1454.
- Kumar, C.G., Anand, S.K. 1998.** Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: A Review. *International Journal of Food Microbiology*. 42(1-2), 9-27.

L

- Larpent, J.P. 2000.** Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux groupes bactériens. Tec and Doc. Lavoisier. Paris, New York, London.
- Lays, C. 2012.** ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus*: Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, Niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques. Thèse de doctorat. Ecole doctorale évolution écosystème microbiologie modélisation. Université de Lyon, France. 221.
- Lazarova, V., Manem, J. 1995.** Biofilm characterization and activity in water and waste water treatment. *Water Research*. 29(10), 2227-2245.
- Le Loir, Y., Gautier, M. 2010.** Monographie de la microbiologie : *Staphylococcus aureus*. Tec et Doc, Lavoisier, Paris.
- Le Minor, L., Veron, M. 1990.** Bactériologie médicale « *Staphylococcus* et *Micrococcus* ». J. Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773- 794.
- Lebeaux, D., Lucet, J.C., Barbier, F.S. 2016.** Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm implications en réanimation. *Réanimation*. 25(3), 08-317.
- Leclerc, H., Gaillard, J.L., Simonet, M. 1995.** Microbiologie générale. Ed, DOIN. Paris.

Leclercq, R. 2002. Résistance des Staphylocoques aux antibiotiques. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. 21, 375-383.

Leclercq, R., Daurel, C. 2008. « L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* ». Elsevier Masson SAS, No 407.

Lee, J.H., 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Applied and Environmental Microbiology. 69, 6489-6494.

Lee, L.Y., Hook, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O., Syribeys, P., Vernachio, J., Brown, E.L. 2004. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. Journal of Infectious Diseases. 190 (3), 571-579.

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.

Lister, J.L., Horswill, A.R. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Frontiers in cellular and infection microbiology. 4, 178.

Long, J.P., Hart, J., Albers, W., Karpal, F.A. 2010. « Les Facteurs de Virulence Autres que les Entérotoxines », in « *Staphylococcus aureus* », Tec et Doc, Paris.

Lorite, G.S., Rodrigues, C.M., De Souza, A.A., Kranz, C., Mizaikoff, B., Cotta. M.A. 2011. The Role of Conditioning Film Formation and Surface Chemical Changes on *Xylella Fastidiosa* Adhesion and Biofilm Evolution. Journal of Colloid and Interface Science. 359(1), 289-95.

Lowy, F.D. 1998 . *Staphylococcus aureus* infections. New England Journal of Medicine. 339(8), 520-532.

Lowy, F.D. 2003. Antimicrobial Resistance: the Example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical investigation. 111(9), 1265-1273.

M

Macfarlane, S., Dillon, J.F. 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology. 102, 1187-1196.

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

Madigan, M., Martinko, J. 2007. Brock biologie des microorganismes. PEARSON

EDUCATION, 11^{ème} édition, 854-856.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A. 2015. Brock Biology of Microorganisms. 14 ed. The United States of America: Pearson Education.

Mainardi, J.L. 2015. « Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques/ session interactive autour de l'antibiogramme». Unité Mobile de Microbiologie Clinique, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges POMPIDOU et Faculté de Médecine Paris René DESCARTES.

Mairi, A., Touati, A., Pantel, A., Zenati, K., Martinez, A.Y., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J.P. 2019. Distribution of Toxinogenic Methicillin Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* from Different Ecological Niches in Algeria. Toxins (Basel). 11(9), 500.

Marchal, M. 2010. Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, France.

Mariani-Kurkedjian, J., Binger, E. 2003. Bactérie pathogènes dans la mucoviscidose, archives de pédiatrie, 2, Paris.

Marinelli, P., Pallares, I., Navarro, S., Ventura S. 2016. Dissecting the contribution of *Staphylococcus aureus* α -phenol-soluble modulins to biofilm amyloid structure. Scientific Reports. 6, 34552.

Marquès, C., Tasse, J., Pracros, A., Collin, V., Franceschi, C., Laurent, F., Chatellier, S., Forestier, C. 2015. Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. Journal of Medical Microbiology. 64(9), 1021-1026.

Martinez, L.R., Casadevall, A. 2007. Cryptococcus neoformans Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. Applied and Environmental Microbiology Journal. 73(14), 4592-4601.

Matallah, A.M., Bouayad, L., Boudjellaba, S., Mebkhout, F., Hamdi, T.M., Ramdani-Bouguessa, N. 2019. *Staphylococcus aureus* isolated from selected dairies of Algeria: Prevalence and susceptibility to antibiotics. Veterinary World. 12(2), 205-210.

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T., Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: An evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology. 24(1), 25-9.

Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H., Schneewind, O. 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. Science. 285 (5428), 760763.

McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S. 2012. Should we

stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*. 10, 39-50.

Menzies, B.E. 2003. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 16 (3), 225-229.

Merghni, A., Bekir, K., Kadim, Y., Dallel, I., Janel, S., Bovio, S., Barois, N., Lafont, F., Mastouri, M. 2017. Adhesiveness of opportunistic *Staphylococcus aureus* to materials used in dental office: *In vitro* study. *Microbial Pathogenesis*. 103, 129-134.

Mootz, J.M., Malone, C.L., Shaw, L.N., Horswill, A.R. 2013. Staphopains Modulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Integrity. *Infection and Immunity Journal*. 81, 3227-3238.

Moroni, P., Pisoni, G., Antonini, M., Villa, R., Boettcher, P., Carli, S. 2006. Short communication: Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. *Journal of Dairy Science*. 89, 2973-2976.

Mulyukin, A.L., Suzina, N.E., Mel'nikov, V.G., Gal'chenko, V.F., El'-Registan G.I. 2014. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Coryne bacterium pseudodiphtheriticum*. *Microbiology Journal*. 83, 149-159.

Muylaert, A., Mainil, J.G. 2012. Résistance bactérienne aux antibiotiques : les mécanismes et leur contagiosité. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 156, 109-123.

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.

Nasr, R., AbuShady, H., Hussein, H., 2012. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of *Staphylococci*. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13, 269-274.

Nasser, W., Reverchon, S. 2007. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 387(2), 381-390.

Navarre, W.W., Schneewind, O. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(1), 174-229.

Nemeghaire, S., Argudin, M.A., Haesebrouck, F., Butaye, P. 2014. Epidemiology and molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage isolates from bovines. *BMC Veterinary Research*. 10, 153.

Neu, T.R., Manz, B., Volke, F., Dynes, J.J., Hitchcock, A.P., Lawrence, J.R. 2010. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in

biofilm systems. *FEMS Microbiology Ecology*. 72(1), 1- 21.

Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M., Foster, T.J. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. 30, 245-257.

Nikaido, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 78, 119-146.

Nilsson, I.M., Lee, J.C., Bremell, T., Ryden, C., Tarkowski, A. 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infection and Immunity Journal*. 65, 4216-4221.

Nilsson, R.E., Ross, T., Bowman, J.P. 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 150(1), 14-24.

Niu, C., Gilbert, E.S. 2004. Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components that Affect Biofilm Formation and Structure. *Applied and environmental microbiology*. 70, 6951-6956.

Normanno, G., Corrente, M., La, S.G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A.L., Virgilio, S., Celano, G.V. 2007. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 117, 219-222.

O

O'May, C., Tufenkji, N. 2007. The Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa* Is Blocked by Cranberry Proanthocyanidins and Other Tannin-Containing Materials. *Applied and Environmental Microbiology*. 77, 3061-3067.

O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D.A., O'Gara, J.P. 2007. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 45, 1379-1388.

O'Riordan, K., Lee, J.C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*. 17, 218-34.

O'Brien, L., Kerrigan, S.W., Kaw, G., Hogan, M., Penades, J., Litt, D., Fitzgerald, D.J., Foster, T.J., Cox, D. 2002. Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Molecular Microbiology*. 44, 1033-1044.

Oliveira, A., Cunha M, L.R.S. 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*. 3, 260.

Otter, J., French, G.L. 2010. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infectious Diseases*. 10, 227-39.

Otto, M. 2018. Staphylococcal biofilms. *Microbiology Spectrum*. 6.

P

Pagedar, A., Singh, J., Batish, V.K. 2010. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. *Journal of Basic Microbiology*. 50, S98-S106.

Papadopoulos, P., Angelidis, A.S., Papadopoulos, T., Kotzamanidis, C., Zdragas, A., Papa, A., Filioussis, G., Sergelidis, D. 2019. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness. *Food Microbiology*. 84, 103249.

Parot, S. 2007. Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.

Pascoe, B., Dams, L., Wilkinson, T.S., Harris, L.G., Bodger, O., Mack, D., et al. 2014. Dormant Cells of *Staphylococcus aureus* Are Resuscitated by Spent Culture Supernatant. Schlievert PM. *PLoS ONE*. 9, 85998.

Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook, M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology*. 48, 585-617.

Patti, J.M., Hook, M. 1994. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Current Opinion in Cell Biology*. 6, 752-758.

Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*. 118, 186-193.

Pellerin, J.L., Gautier, M., Le Loir, Y. 2010. « Identification de l'Espèce au Sein du Genre », in « *Staphylococcus aureus* ». Tec et Doc, Paris.

Percival, S.L., Malic, S., Cruz, H., Williams, D.W. 2011. Introduction aux biofilms. In *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 41-69.

Percy, M.G., Gründling, A. 2014. Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 68, 81-100.

- Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. 2009.** Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*. 26, 278-282.
- Perez, P. 2013.** Typage de *Staphylococcus aureus* par MLVA : étude de faisabilité de la détection par HRM. Thèse de doctorat. Faculté de médecine de Nancy. Université de Lorraine, France.131p.
- 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.
- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N., Nostro, L. 2007.** A Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*. 18, 196-200.
- Peschel, A., Otto, M. 2013.** Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology*. 11(10), 667-673.
- Petinaki, E., Spiliopoulou, I. 2012.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts. *Clinical Microbiology and Infection*. 18, 626-34.
- Pierce, C.G., Uppuluri, p., Tristan, A.R., Wormley Jr, F.L., Mowat, E., Ramage, G., Lopez-Ribot, J.L. 2008.** A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols*. 3, 1494-1500.
- Plata, K., Rosato, A.E., Wegrzyn, G. 2009.** *Staphylococcus aureus* as an Infectious Agent : Overview of Biochemistry and Molecular Genetics of its Pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*. (4), 597-612.
- Poulsen, L.V. 1999.** Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 32, 321-326.
- Pratt L, A., Kolter, R. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 30, 285-293.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D., Bacq-Calberg, C.M., Dusart, J. 2002.** «Microbiologie », 5éme édition, De Boeck.
- Priester, J.H., Horst, A.M., Van De Werfhorst, L.C., Saleta, J.L., Mertes, L.A.K., Holden, P.A. 2007.** Enhanced Visualization of Microbial Biofilms by Staining and Environmental Scanning Electron Microscopy. *Journal of Microbiological Methods*. 68(3),

Q

Quincampoix, J., Mainardi, J. 2001. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif, Éditions scientifiques et médicales, Elsevier SAS, 10.

R

Rachmawati, D., Alimsardjono, L. 2019. The correlation between *icaA* and *icaD* genes with biofilm formation *Staphylococcus epidermidis* *in vitro*. Folia Medica Indonesiana. 55, 251-259.

Rad, J.S., Alfatemi, S.M.H., Rad, M.S., Iriti, M. 2015. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of *Xanthium strumarium* L. extracts on methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ancient Science of Life. 33, 107-11.

Rajagopal, M., Suzanne, W. 2015. Envelope Structures of Gram- Positive Bacteria. Springer International Publishing. 404, 1-44.

Raksha, L., Gangashettappa, N., Shantala, G.B., Nandan, B.R., Sinha, D. 2020. Study of biofilm formation in bacterial isolates from contact lens wearers. Indian Journal of Ophthalmolog. 68, 23-28.

Rebiahi, S.A. 2012. Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat. Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement. Université de Tlemcen, Algérie.131p.

Rechidi-Sidhoum, N., Brugère-Picoux, J. 1992. Manuel de pathologie aviaire. Edition Tec and Doc, Lavoisier, Paris.

Rewatkar, A.R., Wadher, B.J. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 8, 36-40.

Risley, A., Lough Man, A., Cywes-Bentley, C., Foster, T., Lee, J. 2007. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. Journal of the Infectious Diseases. 196, 919-927.

Robert, D. 2013. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. Thèse de doctorat. Université d'Angers, France.126p.

Roberts, M.C., Schwarz, S. 2009. « Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms », in « Antimicrobial Drug Resistance : Mechanisms of Drug Resistance »,

Humana Press, New York.

Roblero, J.J., Sandra R-M., Mario, E-C-D., Juan, CC-D. 2016. *Staphylococcus* Biofilms. Book Microbial Biofilms. 211-230.

Rode, T.M., Langsrud, S., Holck, A., Møretrø, T. 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. International Journal of Food Microbiology. 116, 372-383.

Rodríguez-Lázaro, D., Alonso-Calleja, C., Oniciuc, E.A., Capita, R., Gallego, D., González-Machado, C., Wagner, M., Barbu, V., Eiros-Bouza, J.M., Nicolau, A.I., Hernández, M. 2018. Characterization of Biofilms Formed by Foodborne Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Frontiers in Microbiology. 9, 3004.

Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, MA., Knobloch, JK-M., Heilmann, C., Herrmann, M., Mack, D. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. Molecular Microbiology. 55(6), 1883-1895.

Ross, J.F. 2010. La réponse au farnésol de *Candida albicans*: production de biofilms et parenté génétique. Mémoire de Maîtrise en Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal.

Roux, A., Chigo, J.M. 2006. Les biofilms bactériens. Communication. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France. 3, 262-266.

Ruiz, L., Alvarez-Ordóñez, A. 2017. The role of the food chain in the spread of antimicrobial resistance (AMR). In *Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection : A strategy to Address Microbial Drug Resistance*. Boukheroub, S., Szunerits, S. and Drider, D. pp 23-47. Elsevier.

S

Sakoulas, G., Moellering, R.C. 2008. Increasing antibiotic resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. Clinical Infectious Diseases. 46(5),360-367.

Salaun, S. 2009. Interaction entre la macroalgue brune *Laminaria Digitata* et ses epibiontes bactériens : étude moléculaire et spectroscopique et capacité d'adhésion et formation de biofilm. Thèse de doctorat : Université de Bretagne Sud, 265p.

Sambanthamoorthy, K. 2007. Role of MSA in the regulation of virulence and biofilm formation. L'Université du sud du Mississippi. Edition UMI Microform Etats-Unis. 20-24.

Schaudinn, C., Carr, G., Gorur, A., Jaramillo, D., Costerton, J.W., Webster, P. 2009.

Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *Journal of Microscopy*. 235,124-7.

Schnappinger, D., Hillen, W. 1996. Tetracyclines : Antibiotic Action, Uptake, and Resistance Mechanisms. *Archives of Microbiology*. 165, 359-369.

Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Sari-Belkharroubi, L., Boucherit, K. 2016. Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (Candida- bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journale de Mycologie Médicale*. 27, 20-27.

Sergelidis, D., Angelidis, A.S. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a controversial food-borne pathogen. *Letters in Applied Microbiology*. 64, 409-418.

Seyffert, N., Le Marechal, C., Jardin, J., McCulloch, J.A., Rosado, F.R., Miyoshi, A., Even, S., Jan, G., Berkova, N., Vautor, E., Thiery, R., Azevedo, V., Le Loir, Y. 2012. *Staphylococcus aureus* proteins differentially recognized by the ovine immune response in mastitis or nasal carriage. *Veterinary Microbiology*. 157, 439-447.

Shannon, O., Flock, J.I. 2004. Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis*. 91(4), 779-789.

Shapiro, J.A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*. 52, 81-104.

Shenkman, B., Rubinstein, E., Cheung, A.L., Brill, G.E., Dardik, R., Tamarin, I., Savion, N., Varon, D. 2001. Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions : Roles of agr and sar loci, platelets, and plasma ligands. *Infection and Immunity*. 69, 4473-4478.

Smeltzer, M.S., Lee, C.Y., Harik, N., Hart, M.E. 2009. «Molecular Basis of Pathogenicity », in « *Staphylococci in Human Disease* », Wiley-BlackWell, Singapore.

Soares, M.J., Tokumaru-Miyazaki, N.H., Noletto, A.L., Figueiredo, A.M. 1997. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. *Journal of Medical Microbiology*. 46, 214-221.

Soell, M., Diab, M., Haan-Archipoff, G., Beretz, A., Herbelin, C., Poutrel, B., et al. 1995. Capsular polysaccharide types 5 and 8 of *Staphylococcus aureus* bind specifically to human epithelial (KB) cells, endothelial cells, and monocytes and induce release of cytokines. *Infection and Immunity Journal*. 63, 1380-1386.

- Sospedra, I., Mañes, J., Soriano, J.M. 2012.** Report of toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from food service establishments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 80, 288-290.
- Spicer, W.J. 2003.** *Pratique clinique en bactériologie mycologie et parasitologie*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 28-29.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., Rainey, P.B. 2003.** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular microbiology*. 50(1), 15-27.
- Srednik, M.E., Tremblay, Y.D.N., Labrie, J., Archambault, M., Jacques, M., Cirelli, A.F., Gentilini, E.R. 2017.** Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*. 364, 1-8.
- Srinivasan, A., Dick, D.J., Perl, M.T. 2002.** Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. *Clinical Microbiology Review*. 15(03), 430-438.
- Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. 2004.** Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 52, 917-924.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F. 2007.** Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 115, 891-899.
- Stephen, H.G., Hawkey, P.M. 2006.** *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* 2^{ème} edition. John Wiley office, England, 586pp.
- Stewart, E.J., Ganesan, M., Younger, J.G., Solomon, M.J. 2015.** Artificial biofilms establish the role of matrix interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly. *Scientific Reports*. 5, 13081.
- Stewart, P.S. 1996.** Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40, 2517-22.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W. 2001.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358,135-138.
- Stickler, D.J. 2008.** Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature Clinical Practice Urology*. 5(11), 598-608.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., Klapper, I. 2002.** Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 29(6), 361-367.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology.* 56, 187-209.

Strevett, K.A., Chen, G. 2003. Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology.* 154, 329-35.

Surman, S.B., Walker, J.T., Goddard, D.T., Morton, L.H.G., Keevil, C.W., Weaver, W., Skinner, A., Hanson, K., Caldwell, D., Kurtz, J. 1996. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods.* 25, 57-70.

Switalski, L.M., Speziale, P., Hook, M. 1989. Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1. *Journal of Biological Chemistry.* 264, 21080-21086.

T

Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, JA., Matthews, S., Penades, JR., Lasa, I., Valle, J. 2016. Staphylococcal Bap Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. *PLOS Pathogens.* 12(6), e1005711.

Tally, F.P. 1993. Les Staphylocoques : Abscesses et Autres Maladies, Microbiologies et Pathologies Infectieuses, DeBoeck, Paris.

Tam, K., Torres, V.J. 2019. *Staphylococcus aureus* secreted toxin and extracellular enzymes. *Microbiology Spectrum.* 7, 1-59.

Tan, S.L., Lee, H.Y., Mahyudin, N.A. 2014. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. *FoodControl.* 44, 2013-207.

Tang, Y., Larsen, J., Kjeldgaard, J., Andersen, P.S., Ingmer, H. 2017. Methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark. *International Journal of Food Microbiology.* 249, 72-76.

Tankovic, J., Aubry-Damon, H., Leclercq, R. 1997. Résistance aux antibiotiques et aux autres antibiotiques que les bêta-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. *Médecine des Maladies Infectieuses.* 27, 207-216.

Tawk, M. 2014. Action et contrôle des leucotoxines de *Staphylococcus aureus* sur les cellules cibles, Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, Français, p295.

Tenke, P., Kovacs, B., Jackel, M., Nagy, E. 2006. The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology.* 24, 13-20.

Thakker, M., Park, J., Carey, V., Lee, J. 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infection and Immunity.* 66, 5183-5189.

Thammavongsa, V., Kim, K.H., Missiakas, D., Schneewind, O. 2015. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews Microbiology*. 13, 529-43.

Thapaliya, D., Forshey, B.M., Kadariya, J., Quick, M.K., Farina, S., O'Brien, A., Nair, R., Nworie, A., Hanson, B., Kates, A, Wardyn, S., Smith, T.C. 2017. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA. *Food Microbiology*. 65, 122-129.

Thumu, S.C., Halami, P.M. 2012. Acquired resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics in lactic Acid bacteria of food origin. *Indian Journal of Microbiology*. 52(4), 530-537.

Titouche, Y., Hakem, A., Houali, K., Meheut, T., Vingadassalon, N., Ruiz-Ripa, L., Salmi, D., Chergui, A., Chenouf, N., Hennekinne, J.A., Torres, C., Auvray, F. 2019. Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. *Journal of Dairy Science*. 102(8), 6876-6884.

Titouche, Y., Houali, K., Ruiz-Ripa, L., Vingadassalon, N., Nia, Y., Fatihi, A., Cauquil, A., Bouchez, P., Bouhier, L., Torres, C., Hennekinne, J.A. 2020. Enterotoxin genes and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from food products in Algeria. *Journal of Applied Microbiology*. 129(4), 1043-1052.

Tolker-Nielsen, T., Sternberg, C. 2014. Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy. *Methods in Molecular Biology*. 1149, 615-629.

Tomás, I., Henderson, B., Diz, P., Donos, N. 2010. *In vivo* oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.). Formatex, 597-606.

Trautner, B.W., Darouiche R, O. 2009. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American Journal of Infection Control*. 32 (3), 177-183.

Tremblay, DN., Hathroubi, S., Jacques, M. 2014. Les biofilms bactériens leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 78, 110-116.

Treter, J., Macedo, AJ. 2011. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 835-839.

Trinidad, A.A., Ibáñez, D., Gómez, J.R., García-Berrocal, R., Ramírez-Camacho. 2010. Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical

devices. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.). Formatex.

Tristan, A.M., Bes, H., Meugnier, G., Lina, B., Bozdogan, P., Courvalin., et al. 2007. Global Distribution of Panton-Valentine Leukocidin–positive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Emerging Infectious Diseases. 13, 594-600.

V

Valpi, E., Bridger, J. 2008. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. BioTechniques. 45, 385-409.

Van Houdt, R., Michiels, C.W. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Research in microbiology. 156(5), 626-633.

Van Houdt, R., Michiels, C.W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. Journal of Applied Microbiology. 109, 1117-1131.

Vanassche, T., Peetermans, M., Van Aelst, LNL., Peetermans, WE., Verhaegen, J., Missiakas, DM., Schneewind, O., Hoylaerts, MF., Verhamme, P. 2013. The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related *Staphylococcus aureus* infections. The Journal of Infectious Diseases. 208(1), 92-100.

Vandenesch, F., Etienne, J., Tourret, S., Loulergue, P. 2003. Le Staphylocoque doré résistant à la méthicilline d'origine communautaire. Thèse de Diplôme d'études supérieures. pp 27.

Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamali, T., Venkitanarayanan, K.S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Veterinary Microbiology. 92, 179-185.

Vázquez-Sánchez, D., Habimana, O., Holck, A. 2013. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. Current Microbiology. 66, 110-121.

Venkatesan, N., Perumal, G., Doble, M. 2015. Bacterial resistance in biofilm associated bacteria. Future Microbiology. 10, 1743-1750.

Verbrugh, H.A. 2009. Colonization with *Staphylococcus aureus* and the Role of Colonization in Causing Infection, Staphylococci in Human Disease, Wiley-BlackWell, Singapore.

Verdier, I., Lina, G., Gillet, Y., Vandenesch, F. 2000. Cours de bactériologie: *Staphylococcus*. Centre national de référence des staphylocoques INSERM E0230, Faculté de médecine Laennec, Lyon.

Vitko, N.P., Richardson, A.R. 2013. Laboratory maintenance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Current protocols in microbiology*. 28(1), 9C-2.

Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M.P., Libori, M.F., et al. 2017. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*. 123(4), 1003-18.

W

Wagner, M., Ivleva, N.P., Haisch, C., Niessner, R. 2008. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigation on EPS-Matrix. *Water Research*. 43(1), 1-14.

Wang, D., Wang, Z., Yan, Z., Wu, J., Ali, T., et al. 2015. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin resistant and methicillin sensitive strains in China. *Infection, Genetics and Evolution*. 31, 9-16.

Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., Hooper, D.C. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 1892-1897.

Wang, R., Braughton, KR., Kretschmer, D., Bach, T-HL., Queck, SY., Li, M., Kennedy, AD., Dorward, DW., Klebanoff, SJ., Peschel, A., DeLeo, FR., Otto, M. 2007. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature Medicine*. 13(12), 1510-1514.

Wang, W., Baloch, Z., Jiang, T., Zhang, C., Peng, Z.Li.F., Fanning, S., Ma, A., Xu, J. 2017. Enterotoxigenicity and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated from Retail Food in China. *Front Microbiol*. 8, 2256.

Waters, C.M., Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing : cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*. 21, 319-346.

William, J.G. 2009. Assessing pediatric nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and MRSA. The University of School of Public Health. *Epidemiology & Disease Control Texas* 40.

Williams, D.L., Bloebaum, RD. 2010. Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grown using the CDC biofilm reactor. *Microsc Microanal*. 16(2), 143-152.

Winans S, C., Bassler, B.L. 2002. Mob psychology. *Journal of bacteriology*. 184(4), 873-883.

Wolf, M. 2017. Biofilm biodiversity presented by fluorescent in situ hybridisation. Wroclaw

University of Science and Technology, Faculty of Environmental Engineering, Department of Sanitary Biology and Ecotechnology, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland.

X

Xu, H., Zou, Y., Lee, H.Y., Ahn, J., 2010. Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. *Journal of Food Science*. 75(9), M580-M585.

Y

Yang, X., Qian, S., Yao, K., Wang, L., Liu, Y., Dong, F., et al. 2017. Multiresistant ST59-SCCmec IV-t437 clone with strong biofilm-forming capacity was identified predominantly in MRSA isolated from Chinese children. *BMC Infectious Diseases*. 17(1), 733.

Z

Zapotoczna, M., McCarthy, H., Rudkin, JK., O’Gara, JP., O’Neill, E. 2015. An Essential Role for Coagulase in *Staphylococcus aureus* Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device-Related Infections. *The Journal of Infectious Diseases*. 212(12), 1883-1893.

Zapotoczna, M., O’Neill, E., O’Gara, JP. 2016. Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLOS Pathogens*. 12(7).

Annexes

Annexe 01: Composition chimique des milieux de culture et de solutions

Milieux de culture

Bouillon coeur-cervelle

Composition :

Infusion de cervelle de veau..... 12.5 g
Infusion de coeur de boeuf..... 5.0 g
Peptone..... 10.0 g
Glucose..... 2.0 g
Chlorure de sodium..... 5.0 g
Phosphatase disodique..... 2.5 g
pH 7,2 ± 0,2

Préparation :

37 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20 min.
Pour l'obtention du Gélase BHA on ajoute 15g d'agar bactériologique dans 1l de bouillon BHIB lors de sa préparation.

Bouillon Tryptone Soja

Composition :

Peptone de caséine.....17g
Peptone de soja..... 3g
Chlorure de sodium 5g
Phosphate dipotassique..... 2,5g
Glucose monohydraté..... 2,5g
pH 7,3 ± 0,2

Préparation :

30 g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C, 15 min.

Gélase Mueller-Hinton

Composition :

Infusion de viande de boeuf..... 300 ml
Peptone de caséine..... 17.5 g
Amidon de maïs..... 1.5 g
Agar..... 10.0 g
pH 7,4 ± 0,1

Préparation :

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

Milieu Rouge Congo Agar (RCA)**Composition:**

BHIB.....37 g

Saccharose.....50 g

Agar.....10 g

Rouge Congo.....0.8 g

Eau distillée1000 ml

pH= 7,4

Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Solutions**Cristal violet (0.5%) (Biochem Chemopharma, Nièvre, France)**

Cristal violet 0.5 g

Eau distillée..... 100 ml

Le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)

Na₂HPO₄..... 7mM

NaH₂PO₄.....3 mM

NaCl.....130 mM

pH 7.4

Annexe 02: Les souches *Staphylococcus aureus* testées

Origine	Type du produit	Année d'isolement	Code de la souche	Gènes d'entérotoxines staphylococciques
Alimentaire	Lait de mélange	2013	S6	<i>seb,sep</i>
		2013	S19	/
		2013	S24	<i>seb,sep</i>
		2013	S35	<i>sep</i>
		2014	S44	/
		2014	S45	<i>sea</i>
		2014	S48	<i>seb,sep</i>
		2014	S51	<i>sep</i>
		2014	S52	/
		2014	S53	/
		2014	S55	/
		2014	S60	<i>see</i>
		2014	S61	<i>seb,sep</i>
		2014	S63	<i>seb,sep</i>
		2014	S65	/
		2014	S67	/
		2015	S75	/
		2015	S77	<i>seb,sep</i>
		2015	S78	/
		2015	S86	/
		2015	S87	/
		2015	S91	/
		2015	S92	/
		2015	S94	/
	2015	S97	/	
	2015	S98	/	
	2015	S100	<i>seb,sep</i>	
	2015	S101	<i>seb,sep</i>	
	Lait acidifié (l'ben)	2014	S73	/
		2015	S95	<i>seb,sep</i>
		2015	S96	<i>seb,sep</i>
		2017	S147	/
		2017	S149	/
		2017	S227	<i>seb</i>
		2017	S229	<i>seb</i>
		2017	S232	/
2017		S233	/	
2017		S234	<i>seb</i>	
2017		S235	<i>seb</i>	
Viande hachée	2017	S127	<i>seb</i>	
	2017	S129	/	
	2017	S130	<i>seg,sei</i>	
Pâtisserie	2017	S136	<i>sea</i>	

Suite de l'annexe 2

Alimentaire	Pâtisserie	2017	S138	<i>sea</i>
		2017	S213	<i>seb</i>
		2017	S214	/
		2017	S215	/
		2017	S216	/
		2017	S217	/
		2017	S218	/
		2017	S219	/
		2017	S220	<i>seb</i>
		2017	S221	<i>seb</i>
		2017	S222	/
		2017	S223	/
		2017	S224	/
		2017	S225	<i>seb</i>
	Lait cru	2015	S102	/
		2015	S104	/
		2017	S155	<i>sea,seh</i>
		2017	S163	<i>sea,seh</i>
		2017	S164	/
		2017	S165	<i>sea,seh</i>
		2017	S166	<i>sea,seh</i>
		2017	S168	<i>seg,sei</i>
		2017	S171	<i>seg,sei</i>
		2017	S174	<i>seg,sei</i>
		2017	S201	<i>seg,sei</i>
		2017	S206	<i>sec</i>
		2017	S208	<i>sec</i>
		2017	S211	/
		2017	S230	<i>seb</i>
		2017	S231	<i>seb</i>
		2017	S334	/
	Beurre	2017	S238	<i>seb</i>
		2017	S239	<i>seb</i>
Rayeb	2017	S246	/	
	2017	S247	<i>seb,seg,sei,sej,ser</i>	
	2017	S248	/	
Animale	P. Nasal bovin	2017	S271	/
		2017	S272	<i>ser</i>
		2017	S289	/
		2017	S292	/
		2017	S293	/
		2017	S313	/
		2017	S316	/
		2017	S317	/
		2017	S321	/
		2017	S332	/
2017	S337	/		

Suite de l'annexe 2

Animale	P. Nasal bovin	2017	S338	/
		2017	S412	<i>sed,seg,sei,sej,ser</i>
	P. nasal caprin	2017	S335	<i>sec,ser</i>
		2017	S336	<i>sec</i>
		2021	S494	NT
		2021	S495	NT
		2021	S496	NT
		2021	S497	NT
		2021	S498	NT
		2021	S499	NT
		2021	S500	NT
		2021	S501	NT
		2021	S510	NT
		2021	S511	NT
		2021	S512	NT
		2021	S513	NT
		2021	S517	NT
		2021	S518	NT
		2021	S519	NT
		2021	S520	NT
		2021	S521	NT
		2021	S522	NT
		2021	S523	NT
		2021	S524	NT
		2021	S525	NT
		2021	S526	NT
		2021	S527	NT
		2021	S528	NT
		2021	S529	NT
		2021	S530	NT
		2021	S531	NT
		2021	S532	NT
		2021	S534	NT
		2021	S535	NT
	2021	S536	NT	
2021	S537	NT		
2021	S538	NT		
2021	S539	NT		
2021	S543	NT		
2021	S544	NT		
2021	S545	NT		
2021	S546	NT		
2021	S561	NT		
2021	S562	NT		
2021	S563	NT		
2021	S564	NT		
2021	S565	NT		

Suite de l'annexe 2

Animale	P. nasal caprin	2021	S566	NT
		2021	S567	NT
		2021	S568	NT
		2021	S569	NT
		2021	S570	NT
		2021	S571	NT
		2021	S572	NT
		2021	S573	NT
		2021	S574	NT
	P. Nasal poulet de chair	2017	S402	<i>sed,seg,sei,sej,ser</i>
		2017	S407	<i>sed,seg,sei,sej,ser</i>
		2017	S408	<i>sed,seg,sei,sej,ser</i>
		2021	S502	NT
		2021	S503	NT
		2021	S504	NT
		2021	S505	NT
		2021	S506	NT
		2021	S507	NT
		2021	S508	NT
		2021	S509	NT
		2021	S514	NT
		2021	S515	NT
		2021	S516	NT
		2021	S541	NT
		2021	S542	NT
		2021	S547	NT
		2021	S548	NT
		2021	S549	NT
		2021	S550	NT
		2021	S551	NT
		2021	S552	NT
		2021	S553	NT
		2021	S554	NT
2021	S555	NT		
2021	S556	NT		
2021	S557	NT		
2021	S558	NT		
2021	S559	NT		
2021	S560	NT		

NT : not tested

Annexe 03: Valeurs des diamètres de zone d'inhibition selon le CLSI et la CASFM

Famille	Antibiotiques	Diamètre critique			Références
		Sensible	Intermédiaire	Résistant	
β-lactamines	Pénicilline G	≥29	-	≤28	CLSI02018
	Céfoxitine	≥22	-	<22	CASFM 2020
Aminoglycoside	Gentamycine	≥15	13-14	≤12	CLSI 2018
	Néomycine	≥18	-	<18	CLSI 2018
Macrolides	Erythromycine	≥23	-	≤13	CLSI 2018
Tétracyclines	Tétracycline	≥19	15-18	≤14	CLSI 2018
Quinolones	Ofloxacine	≥18	15-17	≤14	CLSI 2018
Phénicol	Chloramphénicol	≥18	13-17	≤12	CLSI 2018
Inhibiteurs de synthèse de l'acide folique	Triméthoprim-Sulfamethoxazole	≥16	-	≤10	CLSI 2018

Annexe 04: Résultats détaillés de l'antibiogramme pour chaque souche de
***S. aureus* (souches alimentaires et animales)**

ATB Souches	P	FOX	CN	N	E	TE	OFX	C	SXT	Profil de résistance
S6	16	30	24	24	27	30	24	29	30	P
S19	16	34	23	27	26	08	25	26	30	P-TE
S24	15	19	27	23	29	08	06	29	30	P-FOX- TE-OFX
S35	15	19	27	22	28	06	06	28	29	P-FOX- TE-OFX
S44	15	32	14	14	25	10	26	26	30	P-N-TE
S45	41	31	26	22	28	28	27	27	31	/
S48	15	18	27	23	28	07	06	30	29	FOX- OFX-P- TE
S51	13	29	24	23	06	27	23	25	21	E-P
S52	22	30	24	23	28	06	26	27	30	P-TE
S53	15	31	25	15	25	10	24	32	31	N-P-TE
S55	41	32	24	23	28	29	25	28	31	/
S60	16	31	23	21	26	28	26	28	29	P
S61	14	18	26	22	26	07	06	27	28	FOX- OFX-P- TE
S63	11	15	24	22	27	06	06	29	29	FOX- OFX-P- TE
S65	18	33	29	24	28	08	27	30	33	P-TE
S67	18	30	26	24	30	27	26	29	31	P
S73	19	31	26	22	28	06	26	29	26	P-TE
S75	18	31	20	21	30	08	29	27	30	P-TE
S77	21	31	23	20	30	31	31	28	20	P

Suite de l'annexe 4

S78	14	29	22	20	26	06	28	27	24	P-TE
S86	18	30	21	19	27	28	28	26	20	P
S87	15	32	23	23	28	28	30	28	27	P
S91	11	29	23	21	25	06	27	21	25	P-TE
S92	18	30	23	22	29	06	26	27	22	P-TE
S94	12	30	22	11	21	09	25	26	22	N-P-TE
S95	14	16	22	20	26	06	06	23	22	FOX- OFX-P- TE
S96	13	17	22	22	24	06	06	25	27	FOX- OFX-P- TE
S97	15	31	23	22	25	06	24	26	27	P-TE
S98	40	31	29	26	30	06	27	29	16	TE
S100	14	18	22	21	25	06	06	24	28	FOX- OFX-P- TE
S101	12	16	20	20	22	06	06	25	25	FOX- OFX-P- TE
S102	15	29	23	21	25	25	22	24	27	P
S104	15	25	21	20	24	06	21	23	20	P-TE
S127	13	31	21	10	29	29	23	26	30	N-P
S129	43	33	21	20	29	30	23	26	30	/
S130	14	32	21	10	26	29	24	26	28	N-P
S136	06	33	19	19	28	32	30	27	25	P
S138	06	34	19	19	27	30	28	26	25	P
S147	06	32	21	22	27	06	24	28	30	P-TE
S149	08	33	22	19	34	30	25	33	28	P

Suite de l'annexe 4

S155	06	31	21	21	27	30	18	26	29	P
S163	06	36	23	22	27	28	26	30	21	P
S164	06	36	19	20	26	28	22	29	30	P
S165	06	30	20	18	25	28	24	24	26	P
S166	06	32	21	21	27	27	27	26	29	P
S168	06	29	18	18	26	26	22	23	22	P
S171	06	29	18	17	24	26	20	23	22	N-P
S174	06	30	20	19	27	29	23	27	25	P
S201	07	16	21	09	06	06	26	26	29	E-FOX- N-P-TE
S206	12	33	28	22	27	33	28	30	30	P
S208	25	33	28	22	29	31	27	27	30	P
S211	15	34	20	20	28	30	25	26	30	P
S213	22	28	20	17	26	29	24	25	26	N-P
S214	12	28	19	17	25	30	24	25	24	N-P
S215	13	27	21	19	25	31	23	29	24	P
S216	13	28	20	19	25	29	24	23	24	P
S217	15	28	19	19	26	28	24	23	25	P
S218	11	25	20	27	22	26	22	22	22	P
S219	12	26	19	17	25	27	27	25	25	N-P
S220	25	24	23	20	22	25	24	18	29	P
S221	13	30	18	17	24	18	25	24	24	N-P
S222	13	27	19	17	25	25	23	23	24	N-P
S223	11	26	20	19	28	32	30	25	25	P
S224	12	25	20	19	26	26	24	25	22	P
S225	13	25	21	19	17	29	26	25	23	P

Suite de l'annexe 4

S227	40	27	22	21	26	33	26	25	25	/
S229	22	30	20	20	25	30	26	25	25	P
S230	16	28	21	19	26	29	26	26	19	P
S231	15	26	19	19	28	28	26	25	28	P
S232	11	27	21	10	25	11	25	25	27	N-P-TE
S233	12	23	21	10	25	11	24	26	24	N-P-TE
S234	37	28	21	18	27	28	26	26	27	/
S235	13	26	20	10	25	10	26	26	27	N-P-TE
S236	12	24	20	11	27	10	25	25	26	N-P-TE
S238	06	28	21	17	27	25	25	25	21	N-P
S239	06	27	21	10	27	11	25	25	21	N-P-TE
S246	13	17	19	17	06	10	25	06	26	C-E- FOX-N- P-TE
S247	14	17	19	18	06	11	26	06	25	C-E- FOX-P- TE
S248	13	26	19	12	24	10	25	24	25	N-P-TE
S271	22	28	30	25	30	08	18	30	25	P-TE
S272	34	27	22	19	06	11	25	26	27	E-TE
S289	10	23	21	19	25	11	28	25	26	P-TE
S292	08	20	19	17	24	26	26	22	24	FOX-N-P
S293	07	21	17	18	24	10	27	23	24	FOX-P- TE
S313	38	23	20	18	24	27	24	24	27	/
S316	42	24	19	19	29	28	25	26	25	/
S317	35	22	24	23	27	26	25	24	29	/

Suite de l'annexe 4

S321	40	25	20	18	28	27	26	27	25	/
S332	35	25	19	12	22	25	25	24	25	N
S334	37	26	20	16	24	26	25	22	26	N
S335	33	26	11	28	22	20	24	12	23	C-CN
S336	35	26	22	15	21	22	24	22	25	N
S337	18	29	20	19	28	12	29	29	20	P-TE
S338	17	29	20	20	28	11	29	29	20	P-TE
S402	13	18	20	20	06	11	21	08	25	C-E- FOX-P- TE
S407	14	18	17	19	06	11	24	08	25	C-E- FOX-P- TE
S408	14	21	22	19	06	13	29	07	26	C-E- FOX-P- TE
S412	18	30	20	18	25	11	28	27	22	P-TE
S494	6	27	24	25	31	30	27	28	23	P
S495	06	26	25	27	06	28	23	29	06	E-P-SXT
S496	06	22	23	24	29	30	25	28	32	P
S497	06	28	25	25	28	28	28	29	33	P
S498	06	30	28	29	30	31	28	30	35	P
S499	14	31	28	32	35	33	24	32	36	P
S500	06	27	25	24	30	16	30	27	25	P
S501	06	34	29	28	34	34	30	34	39	P
S502	6	25	24	27	30	30	28	29	34	P
S503	6	27	24	26	28	30	28	26	34	P
S504	6	28	25	25	31	29	28	28	33	P

Suite de l'annexe 4

S505	12	28	21	19	28	28	28	27	23	P
S506	13	34	21	28	27	28	28	27	24	P
S507	18	27	22	21	29	33	29	27	26	P
S508	17	28	21	20	27	26	29	28	22	P
S509	18	28	22	20	26	27	29	28	21	P
S510	16	27	19	19	27	30	29	27	28	P
S511	06	26	17	10	06	15	26	23	06	E-N-P-SXT
S512	21	26	11	11	28	27	27	29	22	CN-N-P
S513	15	27	18	19	30	28	31	27	25	P
S514	20	35	18	26	27	25	24	30	30	P
S515	10	28	26	26	6	13	6	28	28	E-OFX-P-TE
S516	12	27	23	25	28	24	23	28	29	P
S517	15	30	24	16	30	28	25	29	30	N-P
S518	20	31	25	28	32	30	26	25	32	P
S519	27	35	28	29	30	28	29	28	33	P
S520	28	30	30	30	30	30	28	30	32	P
S521	26	34	27	26	30	25	25	24	31	P
S522	06	20	11	16	06	10	27	9	24	C-CN-E-FOX-N-P-TE
S523	40	29	22	24	30	27	25	27	31	/
S524	43	25	24	25	27	28	26	29	32	/
S525	50	33	19	18	33	24	27	21	23	/
S526	48	37	28	27	27	28	26	28	29	/
S527	48	29	24	27	28	28	27	28	34	/

Suite de l'annexe 4

S528	44	30	22	22	29	22	25	24	30	/
S529	43	34	21	20	23	26	27	21	21	/
S530	13	15	22	26	06	12	27	8	30	C-E- FOX-P- TE
S531	40	27	19	18	29	15	25	27	27	/
S532	41	26	20	20	26	27	25	23	26	P
S534	17	29	20	20	32	30	29	28	25	P
S535	35	26	18	19	27	26	26	23	25	/
S536	40	26	20	19	25	26	26	23	29	/
S537	14	26	19	19	26	16	27	25	26	P
S538	45	32	21	20	27	28	27	25	29	/
S539	37	26	19	18	28	27	27	25	26	/
S541	20	27	20	19	27	28	29	25	26	p
S542	19	25	21	18	28	28	27	26	27	p
S543	20	32	28	26	06	32	06	21	30	E-OFX-P
S544	43	24	20	20	27	24	28	25	30	/
S545	38	27	23	22	30	25	21	25	28	/
S546	47	30	23	21	28	27	28	23	30	/
S547	20	38	27	26	06	30	9	28	29	E-OFX-P
S548	22	39	28	26	06	34	08	33	30	E-OFX-P
S549	13	29	25	20	09	15	21	27	15	E-P
S550	38	29	24	22	30	15	28	27	29	/
S551	42	28	20	23	34	28	29	29	29	/
S552	40	29	20	20	30	28	27	28	26	/
S553	13	27	16	18	06	17	21	30	6	E-P-SXT

Suite de l'annexe 4

S554	13	26	16	16	08	17	21	32	6	E-N-P-SXT
S555	13	25	17	17	09	15	21	26	6	E-N-P-SXT
S556	12	24	19	18	12	15	23	25	6	E-P-SXT
S557	13	27	22	18	06	17	22	30	15	E-P
S558	13	28	18	15	08	19	20	30	06	E-N-P-SXT
S559	32	26	20	20	30	25	27	24	25	/
S560	15	26	18	19	08	18	22	30	06	E-P-SXT
S561	15	27	26	23	28	17	28	27	27	P
S562	41	30	24	23	31	28	29	27	26	/
S563	31	30	26	30	27	26	19	44	34	/
S564	42	34	26	31	31	28	29	48	33	/
S565	31	29	25	29	30	26	18	13	29	C
S566	36	30	22	22	28	23	26	36	28	/
S567	28	27	21	30	25	25	27	43	28	/
S568	28	28	27	23	25	25	15	39	30	/
S569	29	30	17	26	28	19	19	14	28	C-CN
S570	27	29	17	34	27	19	11	41	28	CN-OFX
S571	28	29	24	33	25	24	21	41	27	/
S572	28	30	27	33	30	26	18	39	32	/
S573	33	31	34	38	33	35	31	23	35	C
S574	27	29	26	24	25	25	17	35	30	/

P : Pénicilline G ; FOX : Céfoxitine ; CN : Gentamycine ; N : Néomycine ; E : Erythromycine
 TE : Tétracycline ; OFX : Ofloxacin ; C : Chloramphénicol ; SXT : Triméthoprim-Sulfaméthoxazole

Annexe 05: Résultats détaillés de la formation de biofilms pour chaque souche de *S. aureus* (souches alimentaires et animales)

La microplaque	ODc	La souche	ODs (valeur moyenne)	Formation de biofilm	Production de slime
Microplaque 1	0,5295	S24	2,4163	Forte	Productrice
		S35	1,9993	Modéré	Productrice
		S48	1,868	Modéré	Productrice
		S63	1,5233	Modéré	Productrice
		S91	2,217	Forte	Non productrice
		S92	2,818	Forte	Productrice
		S94	2,209	Forte	Productrice
		S95	2,995	Forte	Productrice
		S100	2,3933	Forte	Productrice
		S101	2,2333	Forte	Productrice
Microplaque 2	0,7446	S104	2,2493	Forte	Productrice
		S55	1,9103	Modéré	Productrice
		S65	2,5912	Modéré	Productrice
		S67	1,11	Faible	Productrice
		S73	2,6366	Modéré	Non productrice
		S75	1,4683	Faible	Productrice
		S77	2,3266	Modéré	Non productrice
		S78	2,8826	Modéré	Productrice
		S87	2,8646	Modéré	Productrice
		S96	1,8123	Modéré	Productrice
Microplaque 3	0,4468	S97	2,6853	Modéré	Productrice
		S171	2,914	Forte	Productrice
		S227	2,8653	Forte	Productrice
		S229	2,732	Forte	Productrice
		S230	2,9363	Forte	Non productrice
		S231	2,9606	Forte	Non productrice
		S232	3,0906	Forte	Productrice
		S233	3,0326	Forte	Productrice
		S235	2,7943	Forte	Non productrice
		S238	2,7946	Forte	Non productrice
		S239	2,9276	Forte	Productrice
		S246	2,767	Forte	Productrice
Microplaque 4	0,6834	S247	2,362	Forte	Productrice
		S248	2,9286	Forte	Non productrice
Microplaque 4	0,6834	S51	1,1186	Faible	Productrice

Suite de l'annexe 5

Microplaque 4	0,6834	S61	2,2146	Modéré	Non productrice
		S155	1,937	Modéré	Productrice
		S163	2,5296	Modéré	Productrice
		S164	1,0496	Faible	Productrice
		S166	2,703	Modéré	Productrice
		S201	1,974	Modéré	Productrice
		S213	2,4796	Modéré	Productrice
		S215	2,6496	Modéré	Productrice
		S217	2,2913	Modéré	Productrice
		S218	2,562	Modéré	Productrice
		S219	2,9056	Forte	Productrice
		S220	2,91	Forte	Productrice
		S223	2,305	Modéré	Productrice
		S224	3,0593	Forte	Productrice
		S225	2,662	Modéré	Productrice
Microplaque 5	0,2489	S494	3,104	Forte	Non productrice
		S495	2,2653	Forte	Non productrice
		S496	2,1636	Forte	Productrice
		S497	2,3066	Forte	Non productrice
		S498	1,106	Forte	Non productrice
		S499	0,9596	Modéré	Non productrice
		S500	2,5076	Forte	Non productrice
		S501	2,3442	Forte	non productrice
		S502	2,2916	Forte	Productrice
		S503	2,9693	Forte	Non productrice
		S504	2,788	Forte	Non productrice
		S505	3,0703	Forte	Productrice
		S506	3,008	Forte	Productrice
		S507	2,6036	Forte	Non productrice
		S508	2,24	Forte	Non productrice
		S509	1,445	Forte	Productrice
S510	2,7813	Forte	Non productrice		
S511	2,4193	Forte	Non productrice		

Suite de l'annexe 5

Microplaque 5	0,2489	S512	2,7016	Forte	Productrice
		S513	1,536	Forte	Non productrice
Microplaque 6	0,2992	S514	2,6596	Forte	Productrice
		S515	1,9906	Forte	Non productrice
		S516	1,449	Forte	Productrice
		S517	2,6833	Forte	Productrice
		S518	1,9583	Forte	Productrice
		S519	2,4666	Forte	Productrice
		S520	1,663	Forte	Productrice
		S521	1,6213	Forte	Productrice
		S522	1,4853	Forte	Productrice
		S523	2,696	Forte	Productrice
		S524	2,1093	Forte	Productrice
		S525	2,1526	Forte	Productrice
		S526	2,434	Forte	Productrice
		S527	2,7556	Forte	Productrice
		S528	2,621	Forte	Productrice
		S529	1,5096	Forte	Productrice
S530	1,548	Forte	Non productrice		
Microplaque 7	1,1671	S60	2,7583	Modéré	Productrice
		S86	2,6773	Modéré	Non productrice
		S102	2,738	Modéré	Non productrice
		S165	2,8976	Modéré	Productrice
		S168	3,041	Modéré	Non productrice
		S214	2,954	Modéré	Productrice
		S216	2,9053	Modéré	Non productrice
		S221	3,0623	Modéré	Productrice
		S222	2,9593	Modéré	Productrice
Microplaque 8	0,5276	S19	2,6816	Forte	Productrice
		S44	3,0986	Forte	Productrice
		S52	3,0973	Forte	Productrice
		S53	3,0833	Forte	Productrice
		S98	1,8106	Modéré	Productrice
		S127	2,816	Forte	Productrice
		S129	2,9355	Forte	Productrice
		S130	2,934	Forte	Productrice
		S147	2,9143	Forte	Productrice
		S149	2,819	Forte	Productrice
S174	2,9353	Forte	Productrice		

Suite de l'annexe 5

Microplaque 8	0,5276	S531	2,656	Forte	Non productrice
		S532	2,806	Forte	Productrice
		S534	2,1786	Forte	Non productrice
		S535	2,7813	Forte	Productrice
		S536	1,548	Modéré	Non productrice
		S537	2,067	Modéré	Non productrice
		S538	2,122	Forte	Productrice
		S539	2,6096	Forte	Non productrice
		S541	2,295	Forte	Productrice
		S542	2,609	Forte	Productrice
Microplaque 9	0,3179	S543	0,4793	Faible	Non productrice
		S544	0,596	Faible	Non productrice
		S545	0,6603	Modéré	Non productrice
		S546	0,3623	Faible	Non productrice
		S547	0,8116	Modéré	Non productrice
		S548	0,7236	Modéré	Non productrice
		S549	0,7626	Modéré	Non productrice
		S550	0,811	Modéré	Non productrice
		S551	1,0476	Modéré	Productrice
		S552	0,7733	Modéré	Productrice
		S553	1,031	Modéré	Productrice
		S554	1,4616	Forte	Productrice
		S555	0,8836	Modéré	Productrice
		S556	0,938	Modéré	Productrice
		S557	0,799	Modéré	Productrice
		S558	0,6533	Modéré	Productrice
		S559	0,7216	Modéré	Productrice
		Microplaque 10	0,7671	S560	0,558
S561	2,0666			Modéré	Productrice
S562	1,4193			Faible	Productrice
S563	2,1803			Modéré	Non productrice
S564	2,0273			Modéré	Productrice
S565	2,544	Modéré	Productrice		

Suite de l'annexe 5

Microplaque 10	0,7671	S566	1,9876	Modéré	Non productrice
		S567	2,3466	Modéré	Productrice
		S568	2,2146	Modéré	Non productrice
		S569	2,5916	Modéré	Productrice
		S570	2,1346	Modéré	Non productrice
		S571	2,1893	Modéré	Productrice
		S572	1,863	Modéré	Productrice
		S573	1,0706	Faible	Non productrice
		S574	1,937	Modéré	Non productrice
Microplaque 11	0,6090	S6	2,9976	Forte	Non productrice
		S45	2,9625	Forte	Productrice
		S136	2,9776	Forte	Productrice
		S138	2,8463	Forte	Productrice
		S206	2,8403	Forte	Productrice
		S208	2,9406	Forte	Productrice
		S211	3,1003	Forte	Productrice
		S234	2,978	Forte	Non productrice
		S236	3,815	Forte	Non productrice
		S271	3,142	Forte	Non productrice
		S272	3,3856	Forte	Non productrice
		S289	3,115	Forte	Non productrice
		S292	3,8846	Forte	Productrice
		S293	3,3726	Forte	Productrice
		S313	3,358	Forte	Productrice
		S316	2,9796	Forte	Productrice
		S317	2,9696	Forte	Non productrice
		S321	2,93	Forte	Productrice
		S332	2,8463	Forte	Productrice
		S334	3,019	Forte	Non productrice
S335	3,8173	Forte	Non productrice		
S336	2,885	Forte	Non productrice		

Suite de l'annexe 5

Microplaque 11	0,6090	S337	3,7006	Forte	Non productrice
		S338	2,3943	Forte	Non productrice
		S402	2,9776	Forte	Productrice
		S407	1,013	Faible	Productrice
		S408	2,863	Forte	Productrice
		S412	3,1482	Forte	Non productrice