



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2024

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Bensalah Oumayma Kheira – Ben Abdellah Keltoum

Le: lundi 10 juin 2024

Étude comparative des techniques quantitatives et qualitatives de détection de biofilm staphylococcique

Jury:

Mme. Hamlaoui Bochra	Pr	Univ Mohamed Khider de Biskra	Présidente
Mme. Boulmaiz Sara	Pr	Univ Mohamed Khider de Biskra	Encadrante
Dr. Benbelaid Fethi	Pr	Univ Mohamed Khider de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2023-2024

Remerciements



Avant tout, nous exprimons notre gratitude à Allah pour nous avoir inspiré et guidé dans la réalisation de ce travail, qui n'était qu'un rêve auparavant. Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué, directement ou indirectement, à la réalisation de ce projet.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre superviseur, Mme Boulmaiz Sara, pour son soutien inestimable, tant matériel que moral. Ses précieux conseils et son encadrement nous ont permis de bénéficier d'un environnement propice à un travail confortable et productif.

Nous adressons également nos remerciements à tous les enseignants de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie de Hadjeb Biskra, pour les connaissances et les compétences qu'ils nous ont transmises durant ces cinq années de formation. Nos sincères remerciements s'adressent également au comité de discussion qui nous a fait l'honneur de sa présence. Leur intérêt manifeste pour notre travail, ainsi que leurs questions et critiques constructives, ont permis d'enrichir notre réflexion et de clarifier de nombreux points.



Dédicace



Je voudrais dédier ma joie à l'occasion de ce travail à moi-même, qui ai combattu quand j'étais une guerre et une guerrière....

Merci à la femme qui m'a appris à me battre et à me relever quand je tombais, à la femme courageuse qui m'a poussée à aller de l'avant. Merci maman, je crois pouvoir imaginer le bonheur qui a inondé tes yeux. Merci, ma perle précieuse....

Merci au père qui m'a appris à être à la fois la plus belle des femmes et le plus fort des hommes. Papa, qui est fier des choses les plus simples, imagine ce que représente pour toi le jour de ma remise de diplôme...

Merci pour ma joie, mon bonheur et la raison de ma vie, mes princesses Rehab, Fatima, Maryam, et Khadija, et mon petit Islam. Puissiez-vous toujours être mon soutien.

Enfin, à celle qui m'a soutenue tout au long de cette période de travail et bien avant, celle sur qui je peux compter dans mes moments de faiblesse. À toi, Oumayma, je tiens à te remercier et à te dire que tu es une femme exceptionnelle, unique en ton genre. Je suis vraiment chanceuse de t'avoir à mes côtés et je te suis profondément reconnaissante pour tout....

Ben Abdellah Keltoum





Je dédie ce travail à ma mère, je tiens à exprimer ma gratitude la plus sincère envers elle, qui m'a inculqué les valeurs de bienveillance et de la compassion, Son exemple m'a enseigné à voir le bien chez les autres et à agir toujours avec douceur et grâce.

Je dois d'immenses remerciements à mon père pour ses conseils et son soutien indéfectibles. Le fait qu'il ait nourri ma curiosité et ma passion, Il m'a appris la discipline, le courage et à toujours améliorer mes compétences,

Je remercie du fond du cœur ma sœur, Takoua-Allah (Tita), ma complice et une personne extraordinaire. Elle a toujours été mon modèle, m'encourageant à m'épanouir et à poursuivre mes ambitions avec une détermination inébranlable.

Je souhaite également remercier mes grands-parents, une constante source de grand réconfort. À mes amies Malak, Khadîdja et Nousseiba et aux autres (F, M, D, H, N... et d'innombrables autres), je suis éternellement reconnaissante pour la camaraderie et les moments précieux que nous avons partagés tout au long de mon parcours universitaire et de ma vie personnelle.

À mon partenaire Kaltoum, ta présence et ton soutien ont été inestimables ; je n'aurais pas pu réaliser cela sans toi. Merci de m'avoir appris d'innombrables leçons et d'avoir contribué à la formation de mon caractère, cela n'aurait pas été possible sans toi.

Finally, I extend my gratitude to myself for persisting through challenges and maintaining focused on my goals. Always faithful to my principles and values never straying from the path I set. To those who can only exist through me, in my imagination and through the realms of my mind, my comfort throughout this journey.

“Home is behind, the world ahead, and there are many paths to tread through shadows to the edge of night, until the stars are all alight. Then world behind and home ahead, we'll wander back and home to bed.”- JRR Tolkien.

Oumayma Kheira Bensalah



Table des matières

Remerciements	1
Dédicace	2
Table des matières	3
Liste des Tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction générale	1
Partie I. Synthèse bibliographique	0
Chapitre 1 : Le Genre <i>Staphylococcus</i>	3
1.1. Définition.....	3
1.2. Historique	3
1.3. Habitat	3
1.4. Taxonomie et classification	4
1.5. Les Caractères morphologiques, biochimiques et culturels.....	4
1.6. Pouvoir pathogène.....	5
1.7. Les souches <i>Staphylococcus</i> à <i>coagulase négative</i>	6
1.8. Les intoxications alimentaires causées par les SCN.....	7
Chapitre 2 : La production du biofilm et son effet sur la physiologie microbienne et la pathogénicité	8
2.1. Historique	8
2.1. Définition.....	8
2.3. Cycle de formation du biofilm	10
2.4. Biofilms Staphylococciques	12
2.5. Avantages écologiques	13
2.6. Techniques de détection du Biofilm.....	14
Partie II. Expérimentale	0
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	15
1. Contexte de l'étude	15
2. Les souches utilisées	15
3. Mise en culture et purification	15
4. Méthodes de détection de biofilm	18
4.1. Préparation des milieux nécessaires	18

4.2. Méthode Qualitative : Congo Red Agar	18
4.3. Méthode Quantitative : 96 puits microplaque	19
5. Étude Statistique	21
Chapitre 4 : Résultats	22
1. Isolement et identification	22
1.1. Fréquence des souches isolés	23
2. Les Résultats de l'étude Phénotypique.....	23
2.1. Méthode Qualitative : CRA	23
2.2. Méthode Quantitative	25
3. Comparaison des deux méthodes	30
Chapitre 5 : Discussion	34
1. Isolement et Prévalence des Souches	34
2. Méthodes qualitatives CRA.....	35
2.1. La relation entre la formation du Slime et la production du biofilm	36
3. Comparaison des méthodes de détection (CRA vs. MTP)	40
Conclusion.....	42
Références bibliographiques.....	43
Résumés.....	52

Liste des Tableaux

Tableau 1: Les facteurs favorisant la formation de biofilm.	10
Tableau 2: Avantages écologiques des biofilms (Aparna et Yadav 2008).	14
Tableau 3: Les milieux préparés comme étape préparative.	19
Tableau 4: Test Kruskal-Wallis pour déterminer la signification statistique des souches entre eux, et les deux périodes d'incubation entre eux et test Mann-Whitney.	27
Tableau 5: Tableau croisé : Les Souches * Production de biofilm * La période d'incubation.	28
Tableau 6: Test des rangs du Wilcoxon : Production de biofilm observée par Méthode MTP - Production de biofilm observée par Méthode CRA.	32

Liste des Figures

Figure 1. Classification des souches Staphylocoques en se basant sur deux tests de microbiologie clinique : la production de coagulase et la résistance à la Novobiocine (CMI \geq 1,6 g/ml) selon Fleurette (1990), cette classification devait encore être améliorée.....	5
Figure 2. Schéma clinique et épidémiologique des espèces de staphylocoques.....	7
Figure 3. Représentation schématique de la composition de biofilm.....	9
Figure 4. Les Stades de formation du Biofilm.....	12
Figure 5. Codage génétique et biosynthèse du PIA.....	12
Figure 6. Techniques de détection du Biofilm (Goetz et al., 2017 ; O'Toole et Kolter, 1998 ; Coffey et Anderson, 2014 ; Manandhar et al., 2021 ; Yuan et al., 2023).....	14
Figure 7. Les Trente-neuf souches isolées.....	15
Figure 8. LA MÉTHODE DU QUADRANT : la méthode du quadrant pour l'isolement comprend quatre stries individuelles. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la boucle est flambée entre les stries (Leboffe et Pierce, 2011).	16
Figure 9. S.aureus (à gauche) et Staphylococcus à coagulase négative (à droite) sur milieu Chapman (photos personnelles).	17
Figure 10. La méthode de la plaque de micro-titration.	21
Figure 11. Aspect de Staphylococcus aureus sur gélose Chapman (Photo Personnelles).	22
Figure 12. Aspect de Staphylococcus coagulase négative sur Gélose Chapman (Photos personnelles). ..	22
Figure 13. Prévalence des Souches isolées.....	23
Figure 14. Les aspects des souches isolées sur milieu CRA.	24
Figure 15. Capacité de formation de biofilms par les souches de S. aureus et SCN observée par méthode CRA.	25
Figure 16. Formation de biofilm in vitro par technique MTP (Photo personnelle).	26
Figure 17. Comparaison de la production de biofilms après 24 et 72 heures d'incubation par méthode MTP et par méthode CRA.....	28
Figure 18. Comparaison de la production de biofilms entre les souches S. aureus et SCN après 24 et 72 heures d'incubation.	29
Figure 19. La capacité totale de production des souches avec la méthode MTP après 24h d'incubation et 72h d'incubation.....	30
Figure 20. Le pourcentage de production de biofilm détecté par la méthode de la plaque de par la méthode de la plaque de culture tissulaire (après 24 heures d'incubation et 72 heures) et la méthode CRA.	33

Liste des abréviations

α : Alpha (le niveau de signification statistique)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de la variance

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomal

BHI : Bouillon cerveau-cœur

COPS : Staphylocoques à coagulase positive

CLSM : Microscopie confocale à balayage laser

CONS : Staphylocoques à coagulase négative

CRA : Congo Red Agar

df : Degré de liberté

DO : Densité optique

EPS : Substance Polymère Extracellulaire

FISH : Hybridation fluorescente in situ

IBM SPSS : International Business Machines Statistical Package for the Social Sciences

IS : Insertion Sequence

McFarland : Une unité de mesure de la turbidité d'une suspension bactérienne

MSA : Mannitol Salt Agar (Gélose au mannitol et au sel)

MTP : Micro-titer Plate (plaque de micro-titration)

NIH : National Institute of Health (Institut National de la Santé)

PBS : Tampon Phosphate Saline

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

pH : Potentiel Hydrogène

PIA : Polysaccharide intercellulaire adhérent

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*

S. haemolyticus : *Staphylococcus haemolyticus*

S. hyicus : *Staphylococcus hyicus*

SCN : Staphylocoques à coagulase négative

SEM : Microscopie électronique à balayage (Scanning Electron Microscopy)

Sig: Significatif

Sig B: Sigma factor B

TCP : Plaque de culture tissulaire

T : Test (par exemple, test de Wilcoxon, test de Shapiro-Wilk)

TSA : Trypticase Soy Agar (Gélose de Soja Trypticase)

TSB : Trypticase Soy Broth (Bouillon de Soja Trypticase)

U : Statistique U (utilisée dans le test de Mann-Whitney)

W : Statistique W (utilisée dans le test de Wilcoxon)

Wilcoxon : Test de Wilcoxon (un test non paramétrique utilisé pour comparer deux échantillons appariés)

Z : Statistique Z (utilisée dans certaines distributions statistiques)

Introduction générale

Introduction générale

Les bactéries productrices de biofilms, en particulier les espèces de staphylocoques à *coagulase négative* (SCN), présentent des défis pathogènes importants dans les environnements cliniques en raison de leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques, notamment la pénétration restreinte des antibiotiques, les taux de croissance réduits et l'expression des gènes de résistance (**Hassan et al., 2011**). Ces bactéries, comme *S. epidermidis*, qui représente 81 % des isolats de SCN, sont des commensaux courants de la peau humaine et sont impliquées dans des infections hospitalières persistantes (**Oliveira et Cunha, 2010**). La capacité des SCN à former des biofilms leur permet de survivre à des concentrations antimicrobiennes jusqu'à 1500 fois supérieures à celles nécessaires pour éliminer les bactéries planctoniques, compliquant ainsi les schémas thérapeutiques (**Sultan et Nabel, 2019**). Par conséquent, des stratégies efficaces de détection et de gestion sont impératives pour atténuer ce problème (**Manandhar et al., 2021**).

La formation de biofilms par les bactéries présente des défis économiques et sanitaires significatifs en raison de leur résistance accrue aux antibiotiques et aux désinfectants par rapport aux bactéries planctoniques. Cela constitue un risque particulier dans les environnements cliniques et l'industrie alimentaire (**Gajewska et Chajęcka-Wierzchowska, 2020**). Dans les environnements de transformation des aliments, les biofilms présents sur les surfaces des équipements peuvent entraîner une contamination, une diminution de la qualité des produits et des perturbations technologiques telles que l'altération de l'échange thermique, le blocage du flux de liquide, l'augmentation des chutes de pression et la corrosion du métal, facteurs qui entraînent des pertes économiques considérables (**Gajewska et Chajęcka-Wierzchowska, 2020**).

Les staphylocoques à *coagulase négative* (SCN), souvent négligés, sont capables de produire des entérotoxines et représentent donc une menace importante pour la sécurité alimentaire, parallèlement à l'impact bien documenté de *Staphylococcus aureus*, un agent étiologique majeur des maladies d'origine alimentaire à l'échelle mondiale (**Oliveira et al., 2010 ; Rohinishree et Negi, 2011**). Des espèces de SCN, dont *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, ainsi que des espèces à coagulase positive comme *S. hyicus*, ont été détectées dans divers aliments et se sont révélées productrices d'entérotoxines, soulignant leur potentiel de déclenchement d'épidémies de maladies d'origine alimentaire (**Rohinishree et Negi, 2011 ; Mubarak, 2021**).

Dans cette étude, des staphylocoques à *coagulase négative* (SCN) isolés de divers types d'aliments vendus sur la voie publique ont été examinés, en mettant l'accent sur leur capacité à former des biofilms. Cette étude vise à confirmer la pathogénicité des SCN, souvent marginalisés par rapport à *Staphylococcus aureus*, une espèce largement reconnue pour sa capacité à former des biofilms et à provoquer des maladies graves. Pour détecter la formation de biofilms par les isolats, deux méthodes distinctes ont été utilisées : une méthode qualitative, la gélose rouge Congo (CRA), et une méthode quantitative, la plaque de micro-titration (MTP), testées à différentes périodes d'incubation.

L'objectif de cette étude est double : comparer l'efficacité et la fiabilité de ces deux méthodes pour détecter les biofilms formés par les SCN et évaluer si leurs résultats sont complémentaires. De plus, en exploitant ces résultats, il s'agit de démontrer l'étendue de la pathogénicité des SCN et la gravité de leur présence dans les aliments de rue. Par conséquent, les objectifs spécifiques de cette étude ont été décrits comme suit :

- Isolement et purification des SCN à partir d'aliments vendus sur la voie publique.
- Évaluation des biofilms produits par les isolats à l'aide de deux méthodes : CRA et MTP.
- Détermination de l'efficacité et de la fiabilité des méthodes utilisées pour détecter les biofilms.

Cette étude vise à apporter une meilleure compréhension des capacités de formation de biofilms des SCN dans les aliments de rue et à informer des stratégies de détection et de gestion plus efficaces pour atténuer les risques associés.

Partie I.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1.

Le Genre *Staphylococcus*

Chapitre 1 : Le Genre *Staphylococcus*

1.1. Définition

Les staphylocoques, bactéries Gram-positives non mobiles et sans spores, sont présents sur la peau et les muqueuses des mammifères, contribuant à l'équilibre cutané et agissant comme barrière contre les pathogènes (Anacarso *et al.*, 2013 ; Boukera et Daoudi, 2019). Ils sont responsables d'infections diverses chez les humains et les animaux (Gajewska *et al.*, 2020). *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, en particulier, peuvent causer des infections graves en milieu hospitalier, souvent via des dispositifs médicaux et après des chirurgies (Paharik et Horswill, 2016). La formation de biofilms par les staphylocoques sur les surfaces favorise la persistance des infections et complique leur traitement, nécessitant souvent un traitement antibiotique et un drainage chirurgical (Paharik et Horswill, 2016). La résistance aux antibiotiques est une préoccupation majeure, certaines souches étant résistantes à la plupart des traitements, avec la vancomycine souvent comme seule option (Foster, 1996).

1.2. Historique

La découverte et la dénomination des staphylocoques ont marqué une étape essentielle dans l'histoire de la microbiologie. En 1871, ces bactéries ont été observées dans le pus d'abcès (Orenstein, 2011). Les travaux de Robert Koch et Louis Pasteur ont jeté les bases de leur caractérisation (Chaalal, 2013), tandis qu'Alexander Ogston les a nommées "staphylocoques" en 1882 (Orenstein, 2011). Anton Julius Friedrich Rosenbach a isolé et cultivé *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus albus* (aujourd'hui *Staphylococcus epidermidis*) en 1884 (Karthik, 2007). La distinction entre *Micrococcus* et *Staphylococcus* a été clarifiée par Silvestri et Hillen en 1965, grâce à des analyses de l'ADN (Becker *et al.*, 2014).

1.3. Habitat

Le genre *Staphylococcus* englobe un groupe diversifié de commensaux qui colonisent les mammifères sur la peau ou les muqueuses (Paharik et Horswill, 2016). Ces micro-organismes sont ubiquitaires et, chez l'homme, les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* en particulier font partie de la flore cutanée résidente de nombreux individus, souvent porteurs asymptomatiques (Boukera Abbaci et D.N, 2019). Ils jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre physico-chimique

de la peau et servent de barrière de colonisation, prévenant ainsi l'implantation de bactéries provenant de la flore environnante.

1.4. Taxonomie et classification

Jusqu'en 2014, le genre *Staphylococcus* comprenait 47 espèces et 23 sous-espèces (**Becker et al., 2014**). Ces organismes sont classés en deux groupes principaux selon leur capacité à coaguler le plasma : les staphylocoques à *coagulase négative* (SCN) et à coagulase positive, incluant *Staphylococcus aureus* (**Fairbrother, 1940**). Ils maintiennent généralement une association bénigne avec leur hôte, mais peuvent devenir pathogènes après un traumatisme cutané ou l'insertion d'un dispositif médical (**Heikens et al., 2005**). La classification des staphylocoques a évolué grâce à la génomique et la phénotypie, mais leur position phylogénétique précise reste incertaine (**Fleurette, 1990**) (**Fig1**). Basées sur des séquences d'ARNr 16S, les genres *Staphylococcus* et *Macrocooccus* appartiennent aux bactéries Gram-positif avec un faible contenu en ADN G+C, et sont étroitement liés aux *bacilles*, *entérocoques*, *streptocoques*, *lactobacilles* et *listeria*. La suggestion de regrouper *Staphylococcus*, *Gemella*, *Macrocooccus* et *Salinicoccus* dans la famille des *Staphylococcaceae* a été faite (**Irlinger, 2008**).

1.5. Les Caractères morphologiques, biochimiques et cultureux

Les staphylocoques sont des *cocci* Gram positif sphériques, mesurant entre 0,5 et 2,5 µm, souvent groupés en grappes de raisin, et avec un diamètre moyen de 0,8 à 1 µm. Elles sont immobiles, sporulées et souvent acapsulées ou peu aptes à produire une capsule. On les distingue en deux groupes selon leur capacité à produire de la coagulase, les staphylocoques dorés à coagulase positive étant hautement pathogènes, tandis que les staphylocoques à *coagulase négative* sont peu ou pas du tout pathogènes. Sur le plan biochimique, les staphylocoques sont catalases positives, fermentent divers sucres et sont généralement oxydases négatives. Sur la gélose au mannitol et au sel (MSA), *S. aureus* fermente le mannitol et forme des colonies jaunes. Ils tolèrent des concentrations élevées de NaCl et se développent rapidement en milieu liquide, formant parfois un dépôt visible. Sur milieu solide, leurs colonies sont grandes, circulaires et brillantes après 24 heures d'incubation. Le milieu Chapman est utilisé pour isoler spécifiquement *S. aureus*, en particulier dans les environnements hospitaliers, facilitant l'identification par des caractéristiques morphologiques, biochimiques et culturelles (**Guiraud et Rosec, 2004 ; Fauchere et Avril, 2002 ; Kloos, 1999 ; Ploy et al., 2016**).

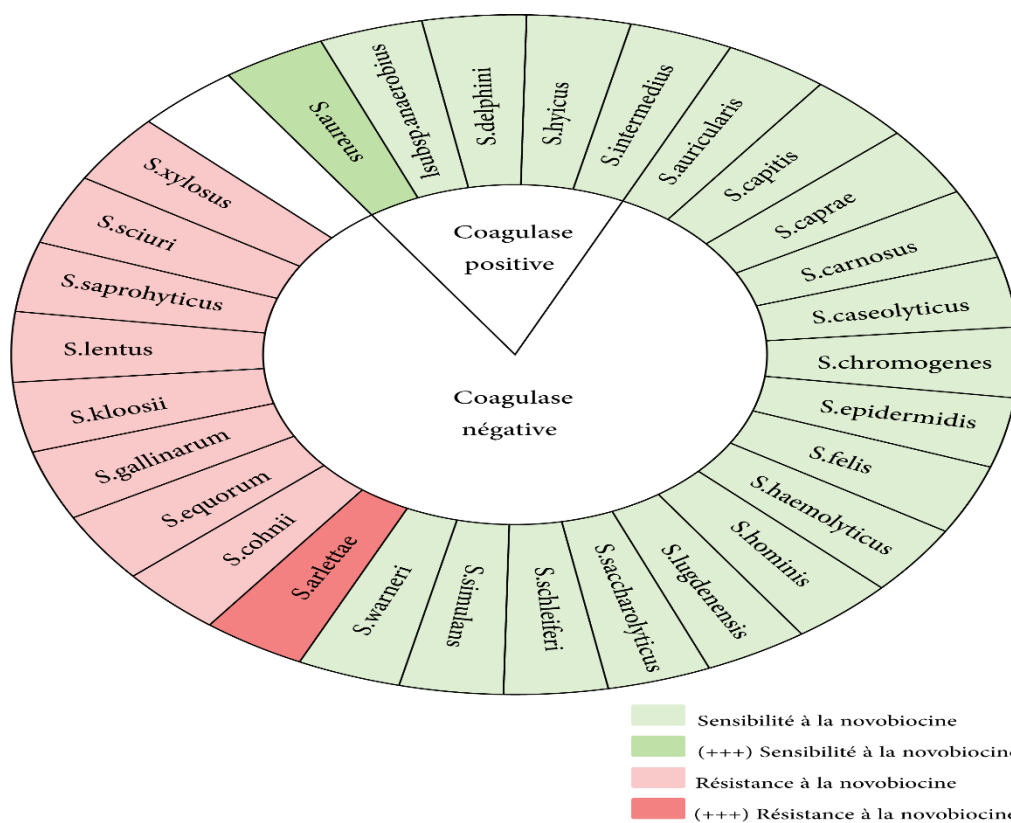


Figure 1. Classification des souches Staphylocoques en se basant sur deux tests de microbiologie clinique : la production de coagulase et la résistance à la Novobiocine (CMI \geq 1,6 g/ml) selon Fleurette (1990), cette classification devait encore être améliorée.

1.6. Pouvoir pathogène

La pathogénicité, ou pouvoir pathogène, des staphylocoques se réfère à leur capacité à causer des troubles dans un organisme. Cette capacité peut résulter de leur virulence, c'est-à-dire de leur aptitude à causer des infections, ainsi que de leur capacité à produire des toxines (Grünfeld, 1994). Les staphylocoques peuvent provoquer une gamme d'infections, allant des infections cutanées mineures aux infections systémiques graves, telles que l'endocardite ou le syndrome de choc toxique (Anacarso *et al.*, 2013).

L'éventail remarquable de facteurs de virulence produits par *S. aureus* et *SCN* contribue à leur pathogénicité. Ces facteurs comprennent des protéines de surface qui facilitent la colonisation bactérienne des tissus de l'hôte, des invasions qui encouragent la propagation des bactéries dans les tissus, des facteurs de surface qui inhibent l'absorption par les phagocytes, des propriétés biochimiques qui améliorent la capacité de survie des phagocytes, telles que la production de catalase, des déguisements immunologiques et des toxines qui lysent les membranes des cellules

eucaryotes ; des exotoxines qui causent des dommages aux tissus de l'hôte ou qui induisent des symptômes de la maladie (**Anacarso et al., 2013**).

Le mécanisme de résistance antimicrobienne chez les staphylocoques implique l'acquisition d'éléments génétiques mobiles tels que des plasmides ou des transposons. La résistance à la pénicilline est due à la production de bêta-lactamases, tandis que la résistance à la tétracycline est conférée par le gène tetM et/ou tetK. De plus, la résistance aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines de type B est liée à la modification de la cible ribosomale, médiée par des gènes tels que ermA, ermB et ermC (**Achek et al., 2018**).

1.7. Les souches *Staphylococcus à coagulase négative*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des agents pathogènes affectant l'homme et d'autres mammifères. Traditionnellement classées en fonction de leur capacité à coaguler le plasma, les staphylocoques à *coagulase négative* (*SCN*) étaient auparavant considérés comme non pathogènes. Depuis 1975, de nouvelles espèces ont été ajoutées, et en 2014, le genre comprenait 47 espèces et 23 sous-espèces, dont 38 coagulase-négatives (**Becker, Heilmann et Peters, 2014**). Autrefois vus comme des commensaux cutanés inoffensifs, les *SCN*, tels que *Staphylococcus epidermidis*, sont maintenant reconnus comme des pathogènes significatifs, notamment chez les personnes immunodéprimées ou porteuses de dispositifs médicaux (**Setiabudy et al., 2023 ; Anacarso et al., 2013**).

Les *SCN* incluent des espèces cliniquement importantes comme *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus haemolyticus* (**Fig2**), souvent impliquées dans les infections nosocomiales liées à l'utilisation de cathéters et autres dispositifs médicaux (**Oliveira et Cunha, 2008**). *S. epidermidis*, en particulier, est capable d'adhérer aux surfaces polymériques et de former des biofilms résistants aux antibiotiques et au système immunitaire (**Huebner et Goldmann, 1999**). Cette capacité à former des biofilms joue un rôle clé dans leur pathogénicité, augmentant l'incidence des infections, surtout chez les patients vulnérables (**Manandhar et al., 2021 ; Goetz et al., 2017**).

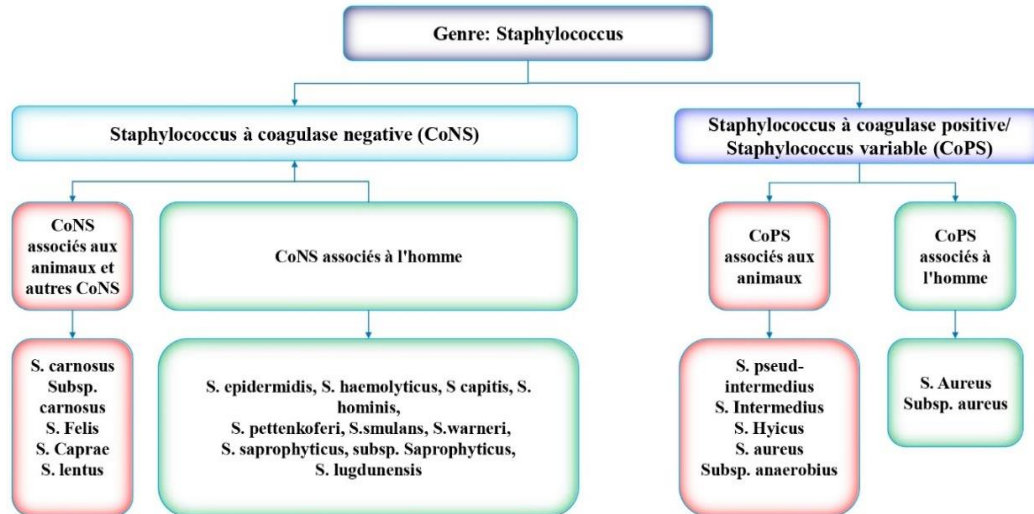


Figure 2. Schéma clinique et épidémiologique des espèces de staphylocoques.

1.8. Les intoxications alimentaires causées par les SCN

Les intoxications alimentaires causées par les staphylocoques à *coagulase négative* (SCN) sont de plus en plus préoccupantes pour la sécurité alimentaire. Bien que traditionnellement considérés comme non pathogènes, certaines souches de SCN peuvent produire des entérotoxines, posant un risque pour la santé humaine. Les intoxications alimentaires staphylococciques étaient principalement associées à *Staphylococcus aureus* à coagulase positive, mais les études récentes montrent que les SCN ont également un potentiel entérotoxigène (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2020 ; Veras *et al.*, 2008). Les entérotoxines produites par les SCN sont résistantes à la chaleur, aux variations de pH et à la digestion enzymatique, ce qui complique leur élimination lors de la transformation et de la conservation des aliments (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2020). De plus, la difficulté à identifier la source spécifique des entérotoxines dans les cas d'intoxication alimentaire rend la gestion des risques encore plus complexe (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2020 ; Veras *et al.*, 2008).

Chapitre 2.
La production du biofilm
et son effet sur la
physiologie microbienne et
la pathogénicité

Chapitre 2 : La production du biofilm et son effet sur la physiologie microbienne et la pathogénicité

2.1. Historique

La première observation de l'existence de biofilms remonte probablement à Antoine Van Leeuwenhoek en 1684 qui a observé les premiers "animalcules" dans la plaque dentaire à l'aide d'un simple microscope (Aparna et Yadav, 2008 ; Mounier *et al.*, 2009). En 1923, Angst a remarqué une concentration beaucoup plus élevée de bactéries accrochées à la coque des bateaux par rapport à l'eau environnante, suggérant leur implication dans la corrosion des coques. Le mot "biofilm" a été utilisé pour la première fois en 1978 par John William Costerton (Setiabudy *et al.*, 2023), des travaux ultérieurs de Jones *et al.* ont révélé la composition complexe des biofilms, notamment la présence de polysaccharides dans leur matrice (Oliveira et Cunha, 2008). Depuis les années 1980, de nombreuses études ont été menées sur les biofilms, démontrant leur présence dans divers environnements. Il est actuellement estimé que 99 % des bactéries vivent dans des biofilms, et selon le National Institute of Health (NIH) aux États-Unis, ces structures sont impliquées dans 80 % des infections humaines (Mounier *et al.*, 2009).

2.1. Définition

Un biofilm se définit comme un agglomérat de cellules microbiennes liées de manière irréversible entre elles sur une surface (biotique ou A-biotique) par une matrice de substance polymère extracellulaire (EPS) (Fig3), une adhésion qui ne peut être éliminée par un simple rinçage doux. La matrice du biofilm peut également contenir des éléments non cellulaires, tels que des cristaux minéraux, des particules de corrosion, de l'argile ou du limon, ainsi que des composants sanguins, selon l'environnement de développement du biofilm (Donlan, 2002). Les organismes dans les biofilms se distinguent de leurs homologues planctoniques par leurs schémas de transcription génique. Les biofilms peuvent adhérer à diverses surfaces, notamment les tissus vivants, les dispositifs médicaux implantés, les conduites des systèmes industriels ou de distribution d'eau, et les environnements aquatiques naturels. L'utilisation de microscopes confocaux à balayage laser (CSLM) a révolutionné la compréhension de la structure et de la fonction des biofilms, permettant de visualiser des échantillons hydratés et révélant ainsi l'architecture tridimensionnelle complexe des biofilms (Davey et O'Toole, 2000). Ces biofilms présentent des agrégats cellulaires au sein d'une matrice d'EPS, formant des canaux d'eau pour la

circulation des nutriments et l'échange de produits métaboliques. La matrice du biofilm, composée d'eau, de cellules microbiennes, d'EPS, de protéines, de polysaccharides, d'ADN et d'ARN, offre un soutien structurel et une protection contre les agressions environnementales, facilitant la rétention des nutriments et l'élimination des déchets (Sutherland, 2001).

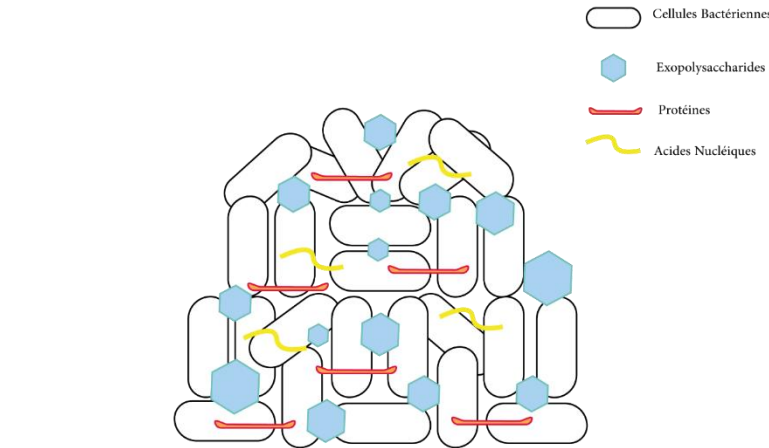


Figure 3. Représentation schématique de la composition de biofilm.

Selon Oliveira et Cunha (2008), les bactéries utilisent les biofilms comme tactique de survie dans divers environnements, y compris les milieux naturels, les systèmes industriels et les dispositifs médicaux tels que les cathéters et les prothèses. Les biofilms servent de bouclier contre les agents chimiques antibactériens, les bactériophages environnementaux et les cellules phagocytaires. Dans les infections liées à la formation de biofilms, les bactéries résistent aux traitements antibiotiques et aux réponses immunitaires de l'hôte, y compris les anticorps et les phagocytes. Les biofilms peuvent se former sur une grande variété de surfaces, y compris les tissus vivants, les dispositifs médicaux à demeure, les canalisations des systèmes industriels ou d'eau potable, ou les systèmes aquatiques naturels. Les organismes associés aux biofilms diffèrent également de leurs homologues planctoniques (en suspension libre) en ce qui concerne les gènes transcrits (Donlan, 2002). La formation de biofilms est induite par des signaux environnementaux (Tableau 1).

Tableau 1: Les facteurs favorisant la formation de biofilm.

Facteurs environnementaux	Méthode d'influence
Disponibilité des nutriments	Influence la croissance bactérienne et la production d'EPS, ce qui a un impact sur le développement du biofilm.
Niveaux d'oxygène	Modifie la respiration bactérienne et les voies métaboliques, affectant la structure et la composition du biofilm.
Température	Modifie l'activité métabolique bactérienne et la sécrétion d'EPS, ce qui a un impact sur la morphologie et l'épaisseur du biofilm.
pH	Modifie l'adhésion bactérienne, la composition des EPS et la stabilité de la matrice du biofilm.
Force de cisaillement	Perturbe l'attachement, la structure et la stabilité du biofilm, influençant la résilience du biofilm.
Facteurs de stress chimiques	Inhibent la croissance bactérienne, perturbent l'intégrité de l'EPS et induisent des réponses au stress, affectant la formation et la sensibilité du biofilm.
Propriétés de surface	Influent sur l'attachement et la colonisation bactérienne, ce qui a un impact sur la formation initiale du biofilm.
Interactions du biofilm	Déterminent la composition et la structure du biofilm par le biais d'interactions synergiques ou compétitives entre les bactéries ou avec les cellules hôtes.
Signaux de détection du quorum	Coordonnent l'expression des gènes et les comportements collectifs au sein des communautés bactériennes, régulant divers aspects de la formation du biofilm, tels que l'adhésion, la production de polystyrène expansé et la maturation.

2.3. Cycle de formation du biofilm

Parmi les *SCN*, *S. epidermidis* est de loin l'espèce la plus souvent récupérée des infections associées au biofilm. Dans le biofilm, d'énormes agglomérats cellulaires bactériens sont enveloppés dans une matrice extracellulaire amorphe composée de produits bactériens tels que les acides téichoïques, les protéines, les polysaccharides et l'ADN extracellulaire (eDNA), ainsi que des produits de l'hôte. Les biofilms peuvent se former sur les surfaces abiotiques des dispositifs médicaux ou sur les surfaces biotiques, telles que les tissus hôtes (**Becker et al, 2014**) (**Fig 3**).

- **Attachement (Stage I)** : au cours de l'étape 1, appelée phase d'attachement, les micro-organismes adhèrent rapidement aux surfaces en réponse aux signaux environnementaux tels que les changements de nutriments, de pH, de température, de concentration d'oxygène, d'osmolalité et de niveaux de fer (**Aparna et Yadav, 2008**). Les surfaces à texture rugueuse, ainsi que les matériaux hydrophobes comme le téflon et les plastiques, sont plus propices à la

formation de biofilms en raison de la réduction des forces de cisaillement et de l'augmentation de la surface. Cette fixation initiale est réversible, certaines cellules se détachant et se fixant à nouveau au substrat. Les cellules bactériennes présentent un taux de croissance logarithmique au cours de cette phase. L'interface solide-liquide entre la surface et le milieu aqueux fournit un environnement idéal pour l'attachement et la croissance, influencé par des facteurs tels que les propriétés du substrat, les films de conditionnement, l'hydrodynamique, les caractéristiques du milieu et les propriétés de la surface cellulaire. La compréhension de ces facteurs est cruciale pour comprendre le processus d'attachement dans la formation du biofilm (**Donlan, 2002**) (**Fig4**).

- **Liaison irréversible (Stage II)** : Après la phase d'attachement, la liaison irréversible se produit quelques minutes plus tard. Les bactéries continuent de se multiplier à la surface et émettent des signaux chimiques qui facilitent la communication entre les cellules bactériennes. Lorsque l'intensité du signal dépasse un certain seuil, les mécanismes génétiques qui sous-tendent la production d'exopolysaccharides (EPS) sont activés. La production d'EPS permet de piéger les nutriments et les bactéries planctoniques, ce qui conduit à la formation d'agrégats cellulaires (**Aparna et Yadav, 2008**).
- **Maturation I (stage III)** : Au cours de ce stade, les agrégats cellulaires se stratifient progressivement, formant un biofilm d'une épaisseur supérieure à 10 μm . Ce stade marque la maturation du biofilm (**Aparna et Yadav, 2008**).
- **Maturation II (Stage VI)** : Au fur et à mesure que le biofilm se développe, il atteint son épaisseur maximale, généralement supérieure à 100 μm . Ce stade se caractérise par la poursuite de la maturation de la structure du biofilm.
- **Dispersion cellulaire (Stage V)** : À ce stade, il y a dispersion des cellules, certaines bactéries adoptant un phénotype planctonique et quittant le biofilm. Cette dispersion commence généralement plusieurs jours après le stade IV.

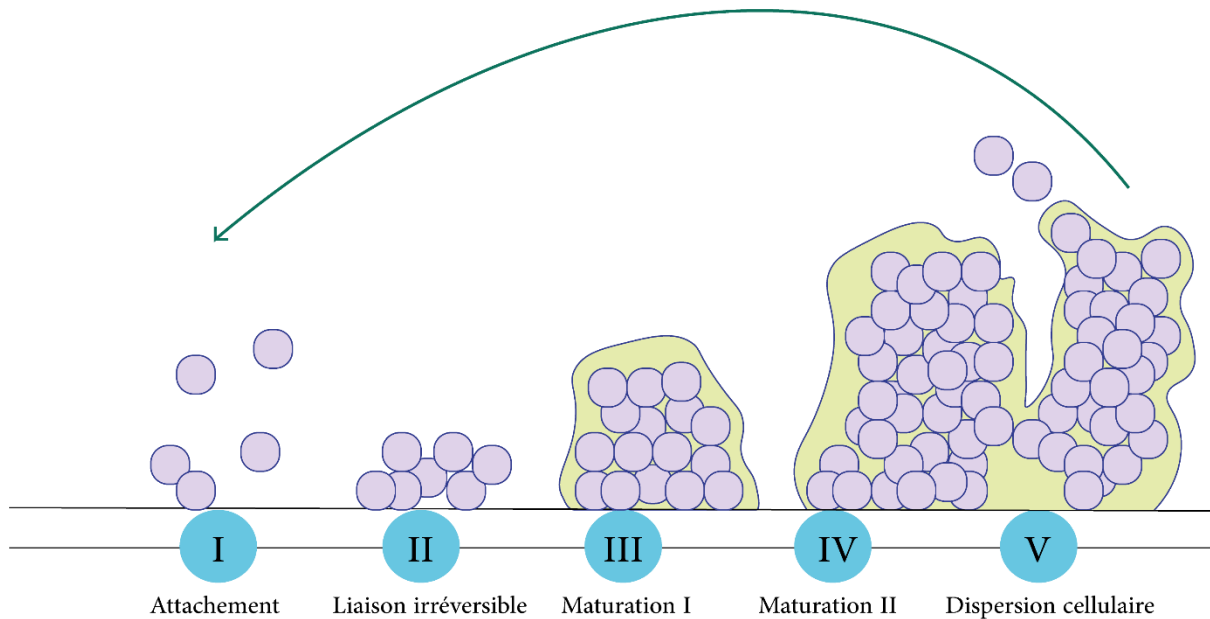


Figure 4. Les Stades de formation du Biofilm.

2.4. Biofilms Staphylococciques

Les staphylocoques, y compris les *SCN*, utilisent des stratégies de virulence spécifiques à l'espèce et à la souche pour l'adhérence, l'invasion et la persistance, avec un accent particulier sur la formation de biofilms chez *S. epidermidis*, bien que leurs mécanismes de virulence soient moins bien compris que ceux de *S. aureus* (Becker *et al.*, 2014).

Les bases génétiques et moléculaires de la formation de biofilms chez les staphylocoques sont multiples. La capacité à former un biofilm présente au moins deux propriétés : l'adhérence des cellules à une surface et l'accumulation pour former des amas de cellules multicouches. La production de la substance visqueuse *PIA* (Fig5), un polysaccharide composé de *bêta* - 1,6 - *N*-acétyl glucosamines liées avec une partie de *diacétyl-glucosamine*, est une marque déposée, dans lequel les cellules sont intégrées et protégées contre les défenses immunitaires de l'hôte et les traitements antibiotiques. Des mutations dans les gènes de biosynthèse correspondants (opéron *ica*) entraînent un phénotype pléiotropique rendant les cellules négatives pour le biofilm et l'hémagglutination, elles ne sont pas résistantes aux antibiotiques. L'expression de l'*ica* est modulée par diverses conditions environnementales, semble être contrôlée par *Sig B* et peut être activée ou désactivée par des éléments de séquence d'insertion (IS) (Aparna et Yadav, 2008 ; Gajewska et Chajęcka-Wierzchowska, 2020).

Tableau 2: Avantages écologiques des biofilms (Aparna et Yadav 2008).

Avantages écologiques des biofilms	Description
Protection contre l'environnement	Les biofilms offrent une protection contre les agressions environnementales telles que les rayons UV, les variations de pH et la dessiccation grâce à leur matrice EPS.
Disponibilité des nutriments et coopération métabolique	Les biofilms favorisent l'échange de nutriments et la coopération métabolique entre les bactéries en créant des niches distinctes et en facilitant l'échange de substrats.
Acquisition de nouveaux caractères génétiques	Les biofilms facilitent le transfert horizontal de gènes, notamment par conjugaison, favorisant ainsi la diversité génétique et l'adaptation des communautés microbiennes.
Transduction à médiation virale	Les bactériophages influent sur la structure et la dynamique des communautés de biofilms par la lyse virale et le transfert de gènes, impactant la diversité microbienne.

2.6. Techniques de détection du Biofilm

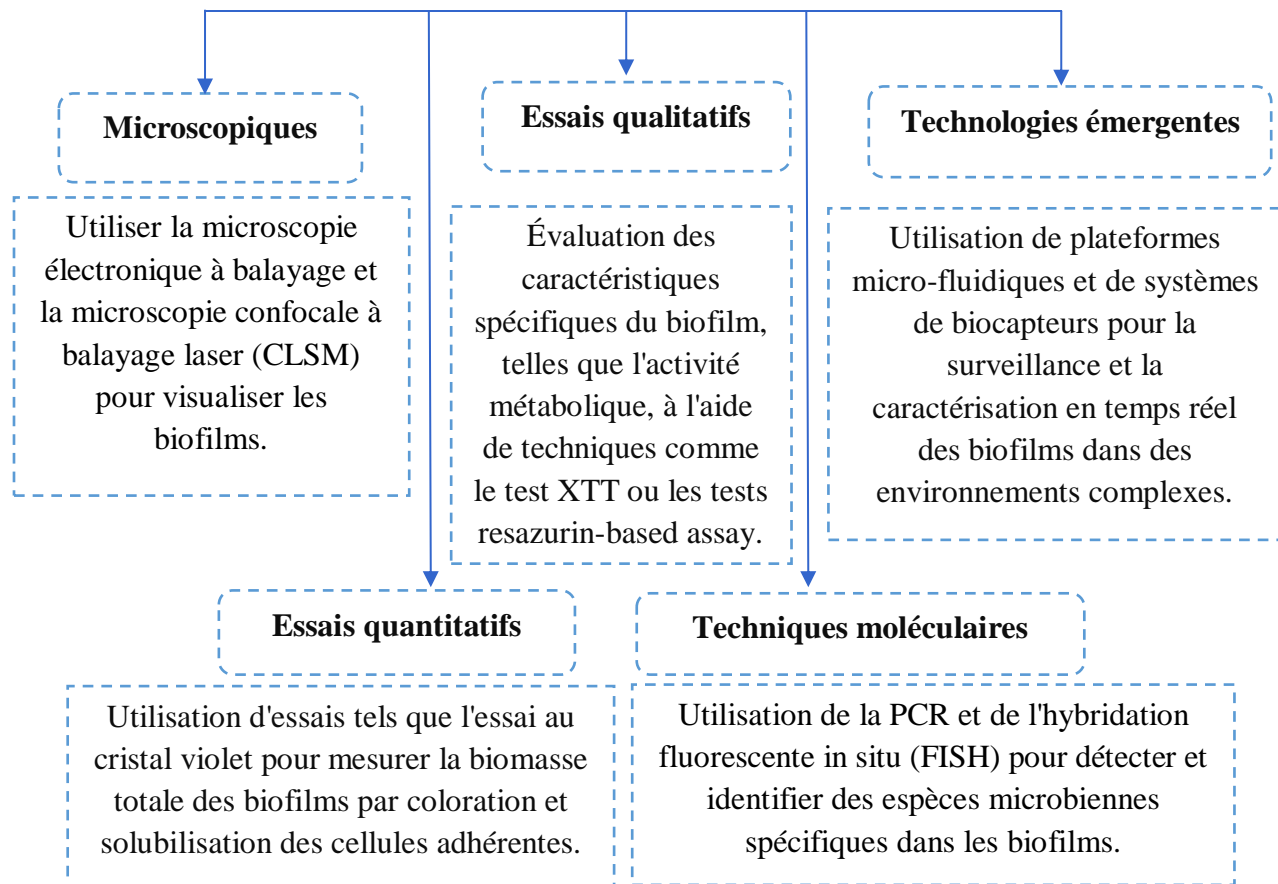


Figure 6. Techniques de détection du Biofilm (Goetz *et al.*, 2017 ; O'Toole et Kolter, 1998 ; Coffey et Anderson, 2014 ; Manandhar *et al.*, 2021 ; Yuan *et al.*, 2023)

Partie II.

Expérimentale

Chapitre 3.

Matériel et méthodes

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Contexte de l'étude

Ce travail vise à isoler les souches de staphylocoques à *coagulase négative* (SCN) à partir des aliments vendus dans la rue, mettant en lumière un aspect crucial de la sécurité alimentaire. Deux approches sont utilisées pour évaluer leur capacité à former des biofilms : la détection de la production de "slime" sur milieu solide Rouge Congo Agar (CRA) et la méthode de la plaque de micro-titration (MTP) pour une évaluation semi-quantitative. L'objectif est de comparer ces deux méthodes afin de déterminer la plus précise et la plus fiable, dans le but d'identifier le protocole optimal pour des implications importantes en sécurité alimentaire et santé publique.

2. Les souches utilisées

Dans cette étude, des échantillons d'aliments de rue collectés à différents endroits ont été traités par d'anciens étudiants sous la supervision du même professeur. Après isolement et purification pour éliminer toute contamination potentielle, les échantillons ont été stockés dans des conditions spécifiques. Certains échantillons ont été exposés à une contamination, nécessitant une purification supplémentaire. Au total, trente-neuf échantillons distincts ont été isolés et étudiés (**Fig7**).



Figure 7. Les Trente-neuf souches isolées.

3. Mise en culture et purification

Les staphylocoques, pathogènes omniprésents connus pour leur capacité à survivre dans les environnements hospitaliers et à provoquer des infections nosocomiales et des infections d'origine alimentaire, se développent facilement sur des milieux hypersalins comme la gélose Chapman. Leur adaptabilité et leur large distribution sont soulignées par leur détection dans diverses sources telles que la viande, le lait, le sol, l'eau de mer et l'air, ce qui souligne l'importance de comprendre leur épidémiologie et leurs caractéristiques pour répondre aux préoccupations de santé publique (**Achek et al., 2020**). En tant que bactéries *aéro-anaérobies* facultatives, ils se développent avec une température de croissance optimale de 37°C et un pH de 7,5, bien qu'ils tolèrent de grandes variations des températures. Sur la gélose Chapman, les colonies présentent des caractéristiques

distinctives : elles sont lisses, rondes, avec des bords nets et mesurent généralement entre 1 et 3 mm de diamètre.

Des mesures strictes ont été prises pour garantir la pureté des souches bactériennes isolées, initialement contaminées. Les échantillons ont été soumis à des subcultures successives sur milieu Chapman à 37°C dans des boîtes de Pétri scellées jusqu'à obtention du degré de pureté désiré. Les souches mannitol positives et négatives ont été séparées pour assurer la fiabilité des résultats. L'isolement des souches individuelles à partir de cultures mixtes a été réalisé en utilisant la technique de la plaque à stries et du quadrant (**Fig8**), permettant aux cellules de se déposer séparément sur la gélose et de former des colonies pures. Cet environnement sélectif permet d'isoler les souches bactériennes souhaitées en vue d'une étude et d'une identification plus poussées (**Leboffe et Pierce, 2011**).

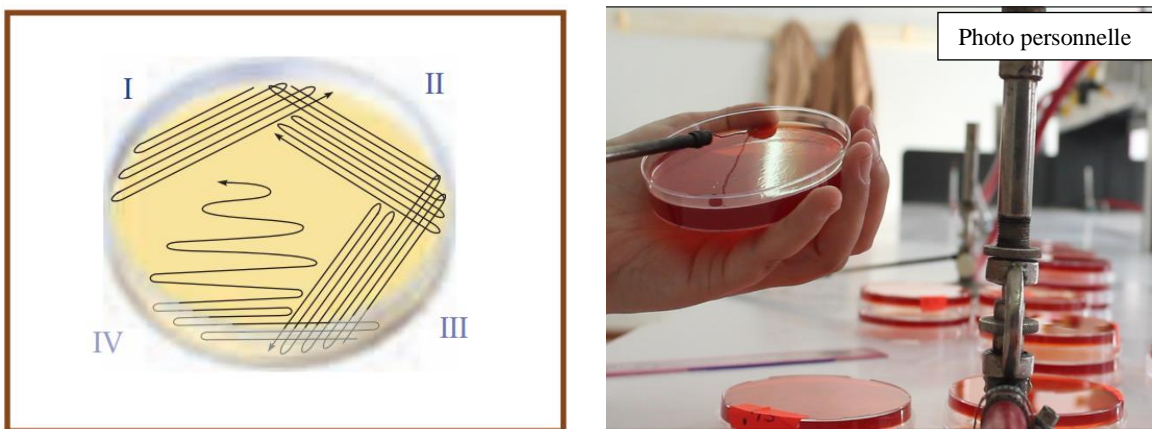


Figure 8. LA MÉTHODE DU QUADRANT : la méthode du quadrant pour l'isolement comprend quatre stries individuelles. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la boucle est flambée entre les stries (**Leboffe et Pierce, 2011**).

Le milieu de Chapman, mis au point par George Chapman et ses collègues du Clinical Research Laboratory de New York dans les années 1930 et 1940, est un milieu gélosé sélectif et différentiel principalement utilisé pour l'isolement et la différenciation des staphylocoques potentiellement pathogènes. La formulation du milieu Chapman a été affinée au fil du temps, en incorporant des éléments clés tels que la gélose au cristal violet et la gélose au lactose et au bleu de bromothymol. Ce milieu tire parti de la capacité des staphylocoques à supporter de fortes concentrations de sel, une caractéristique qui est exploitée en incorporant 7,5 % de chlorure de sodium dans le milieu. La théorie du milieu Chapman repose sur ses propriétés sélectives et

différentielles. La forte concentration de chlorure de sodium (7,5 %) crée un environnement osmotique qui inhibe sélectivement la croissance de la plupart des autres bactéries gram-positives et gram-négatives tout en permettant la croissance des staphylocoques. En outre, le milieu de Chapman contient du mannitol, un sucre, et du rouge de phénol, un indicateur de pH. La fermentation du mannitol par les bactéries entraîne la production d'acide, ce qui conduit à une diminution du pH, qui est détectée par le changement de couleur du rouge de phénol. Plus précisément, à des niveaux de pH inférieurs à 6,9, le milieu apparaît jaune, tandis que dans la gamme des pH neutres (6,9 à 8,4), il apparaît rouge (Shields et Tsang., 2006).

La culture sur gélose de Chapman est une méthode phénotypique couramment utilisée pour isoler les staphylocoques pathogènes. La sélectivité de ce milieu repose sur la présence de chlorure de sodium, favorisant la croissance des staphylocoques en inhibant la croissance d'autres bactéries. La différenciation entre les staphylocoques repose sur leur capacité à fermenter le mannitol, observable par un changement de couleur du milieu en présence de rouge de phénol. Les staphylocoques mannitol-positifs apparaissent jaunes, tandis que les mannitol-négatifs restent rouges, permettant de distinguer clairement les souches et de faciliter leur identification ultérieure. Les *staphylococcus* à coagulase négative ont tendance à ne pas fermenter le mannitol, tandis que les staphylocoques à coagulase positive peuvent le faire, entraînant une coloration jaune du milieu (Zadoks et WATTS, 2009) (Fig9).

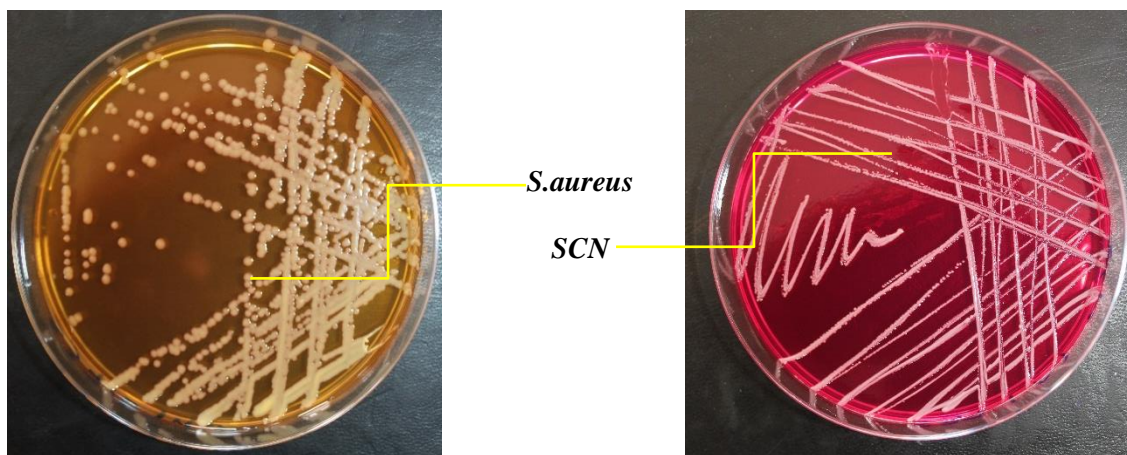


Figure 9. *S.aureus* (à gauche) et *Staphylococcus* à coagulase négative (à droite) sur milieu Chapman (photos personnelles).

4. Méthodes de détection de biofilm

La détection des biofilms est cruciale en microbiologie, médecine et industrie alimentaire. La méthode de la gélose au rouge Congo (CRA) est une approche qualitative couramment utilisée pour évaluer les biofilms. Dans cette méthode, le rouge Congo, un colorant vital, est incorporé dans la gélose (**Halim *et al.*, 2018**).

Les bactéries formant des biofilms produisent une substance extracellulaire qui retient le colorant, formant des colonies rouge à rose vif sur la gélose. Bien que cette méthode permette une visualisation rapide des biofilms, elle ne fournit pas de mesure quantitative de leur quantité

En revanche, la méthode des plaques de micro-titration (MTP/TCP) est une approche quantitative utilisée pour mesurer la formation de biofilms de manière précise (**Halim *et al.*, 2018**). Les suspensions bactériennes sont placées dans des puits d'une plaque de micro-titration contenant un milieu de culture. Les bactéries adhèrent aux parois des puits et forment des biofilms. Après incubation, le milieu est retiré et les puits sont lavés pour éliminer les cellules non fixées. Ensuite, un colorant tel que le cristal violet est ajouté pour marquer les biofilms formés (**Setiabudy *et al.*, 2023**). Après rinçage, le Cristal Violet est libéré des biofilms à l'aide d'un solvant organique, puis la densité optique est mesurée avec un lecteur de microplaques pour quantifier la formation de biofilm. En combinant ces méthodes, nous détectons et quantifions précisément les biofilms, essentiels pour diverses applications en recherche biomédicale et industrie alimentaire.

4.1. Préparation des milieux nécessaires

Avant de commencer les protocoles des méthodes de détection, plusieurs préparations ont été effectuées pour les milieux et les réactifs nécessaires les composants de chaque milieu préparé sont résumer dans (**Tableau 3**). Le milieu de conservation a été préparé pour inoculer les souches dans des tubes après avoir terminé les protocoles, afin de les préserver pour de futures manipulations.

4.2. Méthode Qualitative: Congo Red Agar

Avant la transplantation des échantillons sur la gélose Congo Red, une préparation minutieuse était essentielle pour des résultats précis. Les échantillons, fraîchement préparés à partir de cultures sur gélose Chapman incubées pendant 24 heures, permettaient aux bactéries de se développer et de se stabiliser avant leur transfert sur le milieu Congo Red Agar.

Le milieu Congo Red Agar utilisé dans cette expérience était préparé selon le protocole fourni par Rewatkar et Wadher, 2013, composé de plusieurs composants essentiels, 37 g/L de bouillon BHI qui fournit les nutriments nécessaires à la croissance des bactéries, tandis que 12 g/L de base agar sert de support solide pour la croissance des colonies, 36 g/L de saccharose, ajouté comme source de carbone, favorise la croissance bactérienne et 0,8 g/L d'indicateur Congo Red préparé séparément sous forme de liquide concentré, tous les ingrédients ont été ajoutés à 1 litre d'eau distillée puis chauffées sur la plaque chauffante à 190°C.

Tableau 3: Les milieux préparés comme étape préparative.

Milieu	Ingrédients	Conditions de conservation
Congo Red Agar (CRA).	- 37 g/L d'infusion de cœur de cerveau (Brain Heart Infusion), 12 g/L de base d'agar, 36 g/L de saccharose, 0,8 g/L de colorant rouge Congo. (1L d'eau distillée)	Inférieure à 20 °C
Trypticase Soy Broth (TSB).	30 g de poudre Biokar TSB + 1% de glucose	
Trypticase Soy Agar (TSA).	30 g de poudre de TSB de Biokar, 13 g de base d'agar	

Le milieu CRA, une fois préparé, a été inoculé avec précaution avec les isolats bactériens pour éviter la contamination croisée. Après incubation à 37°C pendant 48 heures, les colonies ont été évaluées en fonction de leur couleur. Les colonies noires sur un milieu rouge/noire, colonies rouges sur milieu noire, colonies rouges sur un milieu rouge foncé indiquent un résultat positif (Production Forte ou Moyenne) pour la formation de biofilm, tandis que les colonies rouges et visqueuse/sèches sur un milieu rouge indiquent un résultat négatif (Faible ou phénotype négatif) (Freeman *et al.*, 1989 ; Aparna et Yadav, 2008). Ces observations ont permis d'évaluer la capacité de formation de biofilm des souches bactériennes testées.

4.3. Méthode Quantitative : 96 puits microplaque

La capacité des souches bactériennes à former des biofilms a été évaluée par la méthode décrite par Gajewska et Chajęcka-Wierzchowska (2020), en utilisant des plaques de polystyrène stériles de 96 puits à fond plat. Pour commencer, 200 μ L de bouillon trypticase soja stérile frais ont été ajoutés dans chaque puits. Ensuite, une culture de souches bactériennes (20 μ L), avec une densité de 0.5 *McFarland* a été introduite dans les puits en trois répétitions, tandis que les puits témoins n'ont pas reçu d'ajout de culture bactérienne. Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C pour permettre la formation de biofilms.

Après incubation, le contenu de chaque puits a été retiré et lavé trois fois avec du tampon PBS pour éliminer les cellules non fixées. Les biofilms ont été fixés avec de l'éthanol à 96 %, puis colorés avec Cristal Violet et lavés pour éliminer l'excès de colorant. Ensuite, le Cristal Violet lié aux biofilms a été dissous dans 160 μ L d'acide acétique glacial à 33 %. L'absorbance à 575 nm a été mesurée avec un lecteur spectrophotométrique de microplaques (Fig 10). La densité optique de chaque souche a été déterminée en moyennant trois répétitions. Les valeurs ont été comparées à une valeur seuil prédéterminée pour évaluer la formation de biofilm. L'expérience a été répétée avec des périodes d'incubation de 24 heures et 72 heures, fournissant des données fiables pour l'analyse comparative des souches bactériennes. Après la manipulation les souches ont été ensemencé sur milieu Chapman un dernier foie pour la conservation et le stockage dans les tubes de milieu de conservation préparé précédemment.

- ✓ **Faibles Producteurs de Biofilm : DO moyenne de la souche < DO moyennes des contrôles négatives.**
- ✓ **Moyens Producteurs de Biofilm : DO moyennes des contrôles négatives < OD < 2x DO moyennes des contrôles négatives.**
- ✓ **Forts Producteurs de Biofilm : OD > 2x DO moyennes des contrôles négatives.**

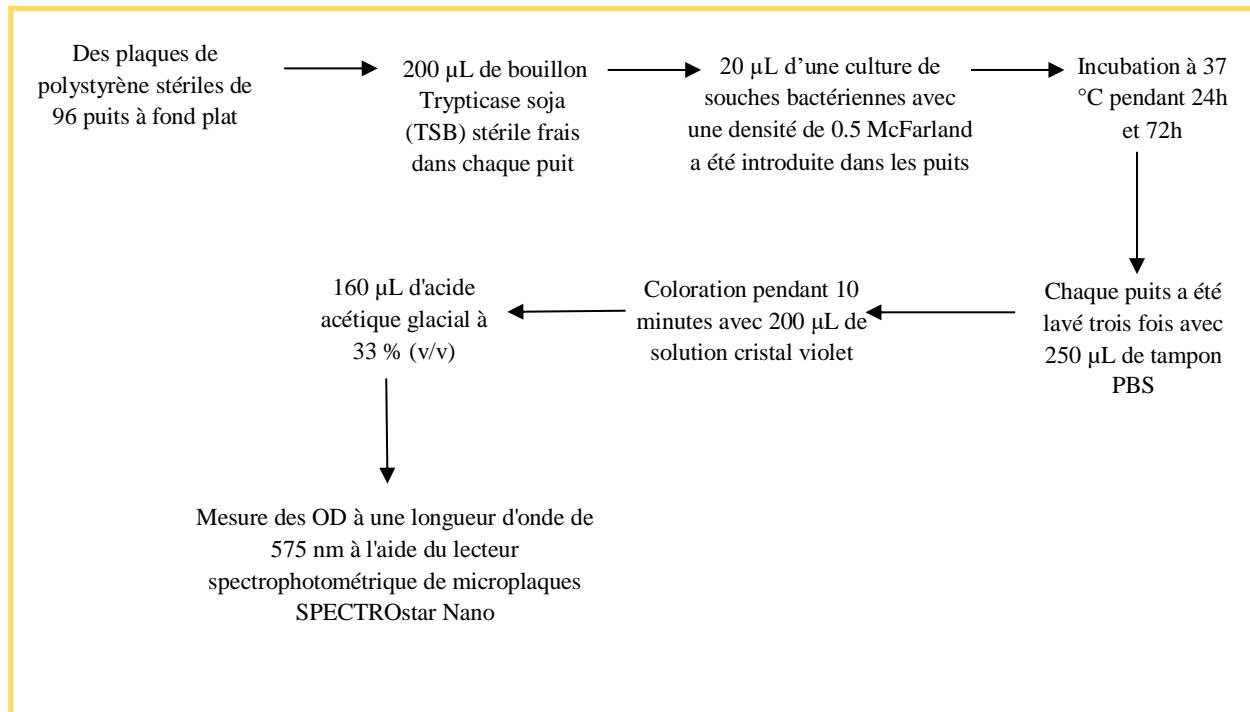


Figure 10. La méthode de la plaque de micro-titration.

5. Étude Statistique

Pour déterminer s'il existe une différence significative entre les souches dans chaque méthode (CRA et méthode des puits), ainsi que la différence entre les deux temps, et enfin la différence significative entre les deux méthodes, nous devons effectuer une analyse statistique appropriée en utilisant le logiciel statistique IBM SPSS avec un seuil de signification fixé à $\alpha = 0,05$. Les résultats obtenus permettront de tirer des conclusions éclairées sur la formation des biofilms des souches bactériennes étudiées. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les résultats de la production de biofilm de la méthode CRA avec ceux de la méthode MTP après 24 heures d'incubation et les résultats de la production de biofilm de la méthode CRA avec ceux de la méthode MTP après 72 heures d'incubation. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé comme alternative à One-Way-ANOVA test pour comparer la production de biofilm entre les deux périodes d'incubation et pour comparer la capacité de production de biofilm entre les deux souches.

Chapitre 4.

Résultats

Chapitre 4 : Résultats

1. Isolement et identification

L'isolement sur milieu gélosé au sel de mannitol a permis de distinguer deux phénotypes différents parmi les souches étudiées. D'une part, les souches capables de fermenter le mannitol ont été classées comme appartenant à l'espèce *S. aureus*, tandis que d'autre part, les souches incapables de fermenter le mannitol ont été considérées comme des staphylocoques à *coagulase négative* (SCN).

La plupart des souches de *S. aureus* développent un pigment jaune doré distinctif dans le milieu, une caractéristique qui donne à l'espèce son nom, "*aureus*", dérivé du mot latin signifiant "or" (**Fig11**).



Figure 11. Aspect de *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman (Photo Personnelles).

Les bactéries capables de fermenter le mannitol présentent une coloration jaune autour de leurs colonies sur le milieu Chapman (**Fig1**), tandis que les bactéries non fermentaires présentent généralement une couleur rouge à rose due à la dégradation de la peptone (**Fig12**).

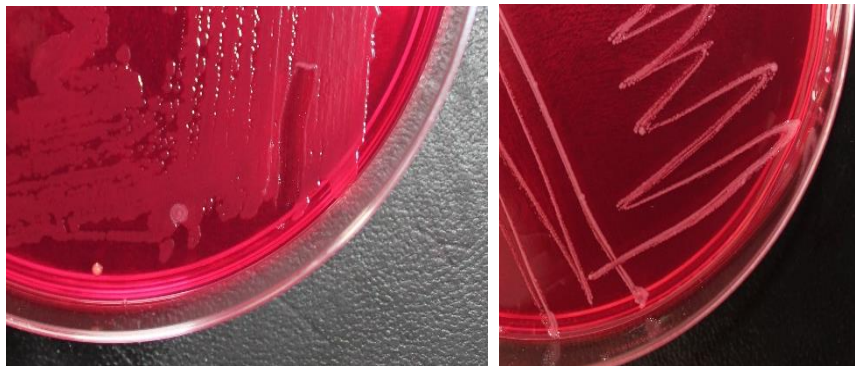


Figure 12. Aspect de *Staphylococcus coagulase négative* sur Gélose Chapman (Photos personnelles).

1.1. Fréquence des souches isolés

Une analyse des fréquences réalisée dans le logiciel SPSS a permis d'examiner la distribution de ces deux groupes de souches. Sur les 39 souches testées, 18 ont été identifiées comme appartenant à *S. aureus*, ce qui représente 46% du total des souches étudiées. En revanche, 21 souches ont été classées comme des *SCN*, représentant ainsi 54% de l'échantillon total (**Fig13**). Cette répartition des souches entre *S. aureus* et *SCN* soulève des questions intéressantes quant à la prévalence et à la distribution de ces deux espèces dans l'échantillon étudié, et mérite une discussion approfondie dans le cadre de l'interprétation des résultats.

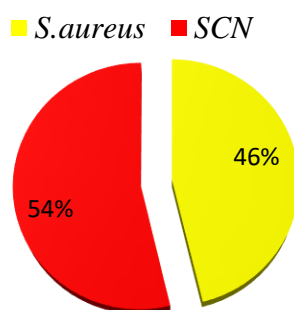


Figure 13. Prévalence des Souches isolées.

2. Les Résultats de l'étude Phénotypique

2.1. Méthode Qualitative : CRA

Les 39 souches ont été classées en 3 phénotypes en fonction de l'apparence des colonies sur le milieu gélosé rouge Congo : Faible production, Moyenne et Forte (**Fig14**).

- **(2,1)** : Production Faible, **1** : Colonies rouges et visqueuse sur un milieu rouge. **2** : Colonies rouges et sèches sur un milieu rouge.
- **(3,4)** : Production Moyenne, **3** et **4** : Colonies rouge bordeaux sur un milieu rouge foncé.
- **(5, 6, 7)** : Production Forte, **5** : Colonies noires sur milieu rouge. **6** : Colonies rouge sur milieu noire. **7** : Colonies noires sur milieu rouge foncé. **8** : Colonies noires sur milieu noire.

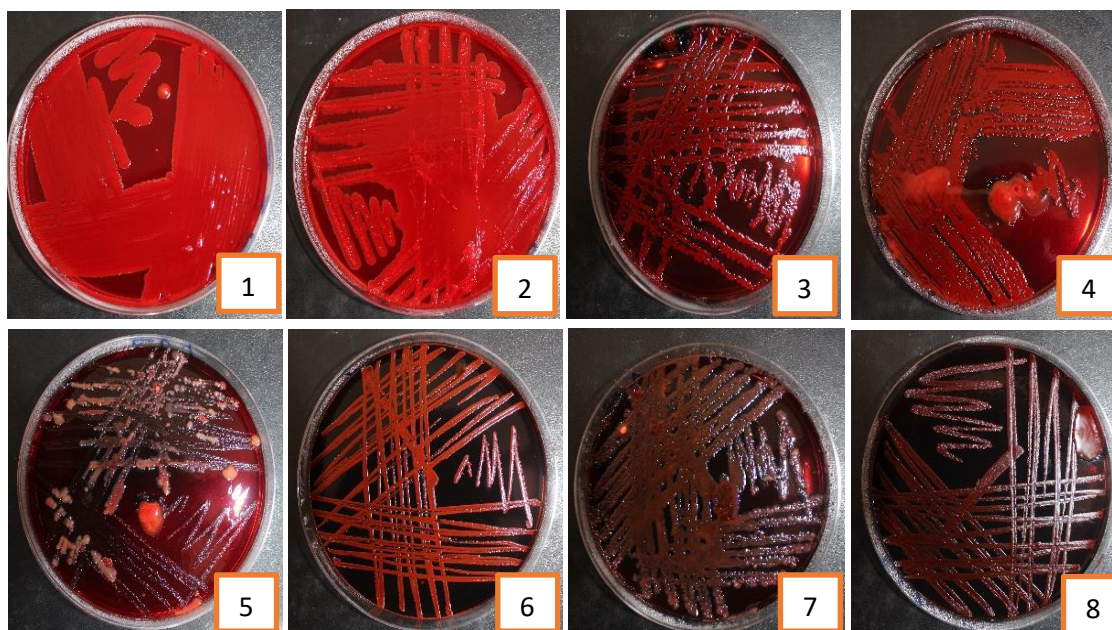


Figure 14. Les aspects des souches isolées sur milieu CRA.

Les résultats de cette évaluation qualitative ont révélé une répartition des souches en différents phénotypes de formation de biofilm.

La distribution des fréquences montre que les souches de *S. aureus* et de *SCN* présentent des capacités variables à former des biofilms. Parmi les souches de *S. aureus*, la distribution des producteurs de biofilms faibles et producteurs de biofilms forts/Moyen était égale (23.07 %). Pour les souches de *Staphylococcus* à *coagulase négative*, les producteurs de biofilms Fort/Moyen étaient les plus répandus (38,46 %), suivis des producteurs de biofilms faibles (15.38 %) (**Fig15**). La méthode CRA a détecté une production positive (Forte et moyenne) parmi 61.53 % des souches isolées (**Fig20**).

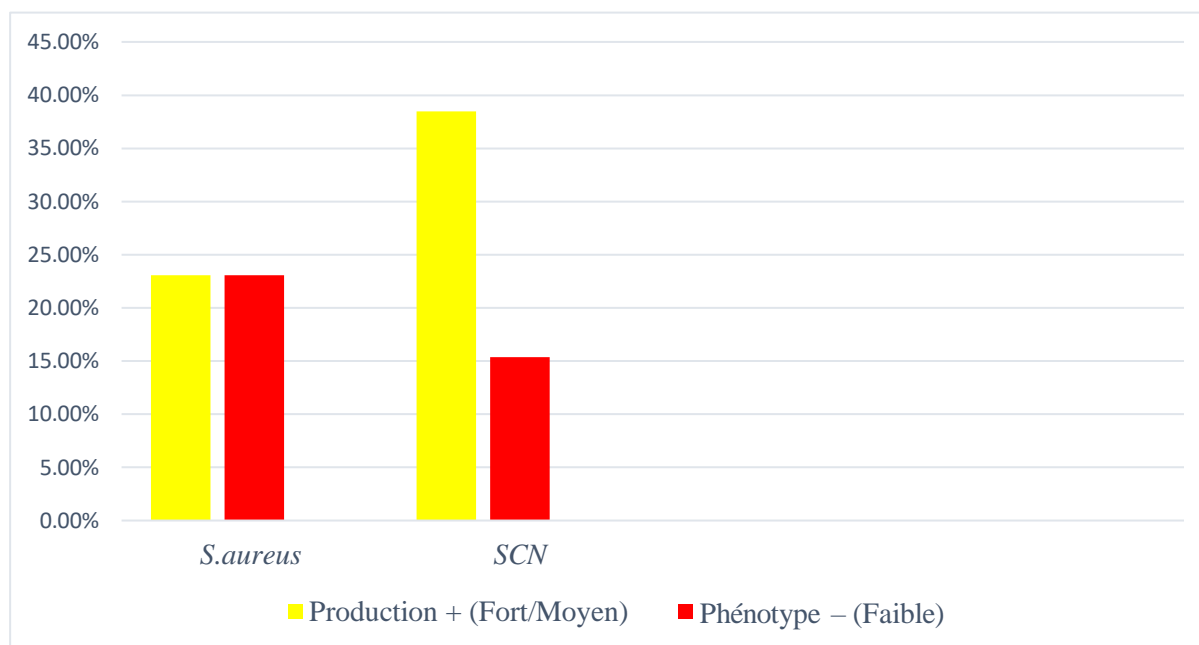


Figure 15. Capacité de formation de biofilms par les souches de *S. aureus* et *SCN* observée par méthode CRA.

Pour évaluer statistiquement la significativité de ces résultats, nous avons utilisé le test du chi-deux de Pearson.

La valeur du chi-deux de Pearson de (2,050) avec une valeur *sig* de (0,359) indique qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la capacité de formation de biofilms entre les deux groupes de souches. La valeur *sig* est supérieure au seuil de signification admis α (0,05), ce qui suggère que toute différence observée dans la production de biofilms est probablement due au hasard plutôt qu'à une véritable différence entre les groupes. Cette observation soulève des questions sur les mécanismes de formation de biofilm et la virulence potentielle de ces souches dans des environnements réels, et suggère la nécessité d'une analyse plus approfondie dans le cadre de la discussion des résultats.

2.2. Méthode Quantitative

La technique de plaque de micro-titration comprend une lecture semi-qualitative et une évaluation quantitative de la production du biofilm. Dans un premier temps, une lecture semi-qualitative des puits où le biofilm est formé permet de classer ce dernier comme aucune production, production modérée ou faible en fonction de l'intensité de la coloration au violet cristal récupérée par l'acide acétique glacial (**Fig16**).

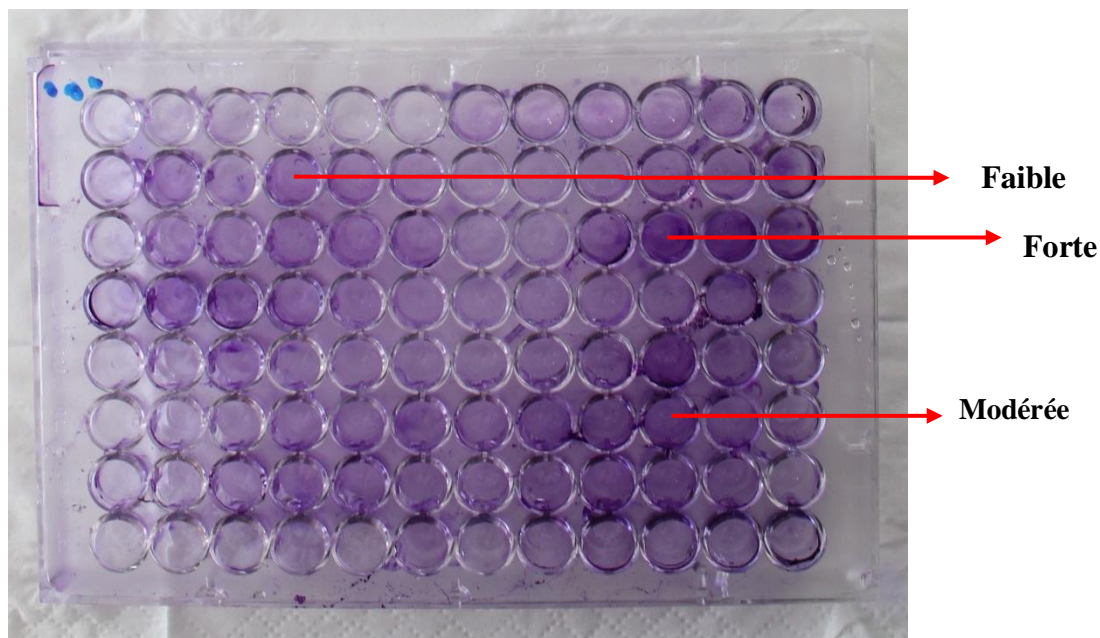


Figure 16. Formation de biofilm in vitro par technique MTP (Photo personnelle).

Les premiers tests de normalité effectués à l'aide du test de Shapiro-Wilk ont révélé une distribution non normale pour la production de biofilm et les valeurs de DO ($Sig < \alpha (0,05)$), tandis que l'homogénéité des variances a été confirmée par le test de Levene ($Sig > \alpha (0,05)$).

Du fait que les données ne répondent pas à l'hypothèse de normalité, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé comme alternative à One-Way-ANOVA test. Les résultats du test n'ont pas montré de différence significative dans la production de biofilms entre *S. aureus* et *SCN* ($sig = 0,066$) ni de différence significative dans les valeurs de DO entre les deux types de souches ($sig = 0,121$) (**Tableau 4**). Cependant, en comparant les deux périodes d'incubation, le test de Kruskal-Wallis a révélé des différences significatives à la fois dans la production de biofilm et dans les valeurs de DO ($sig (0,001) < \alpha (0,05)$) (**Tableau 4**).

Pour mettre en évidence les différences spécifiques, un test de Mann-Whitney a été effectué, confirmant des différences significatives entre les périodes d'incubation de 24 heures et de 72 heures pour la production de biofilm ($sig (0,011) < \alpha (0,05)$) et les valeurs de DO ($sig (0,001) < \alpha (0,05)$). Ces résultats indiquent que si le type de souche (*S. aureus* vs *SCN*) n'affecte pas de manière significative la capacité de formation de biofilm, la période d'incubation a un impact significatif.

Tableau 4: Test Kruskal-Wallis pour déterminer la signification statistique des souches entre eux, et les deux périodes d'incubation entre eux et test Mann-Whitney.

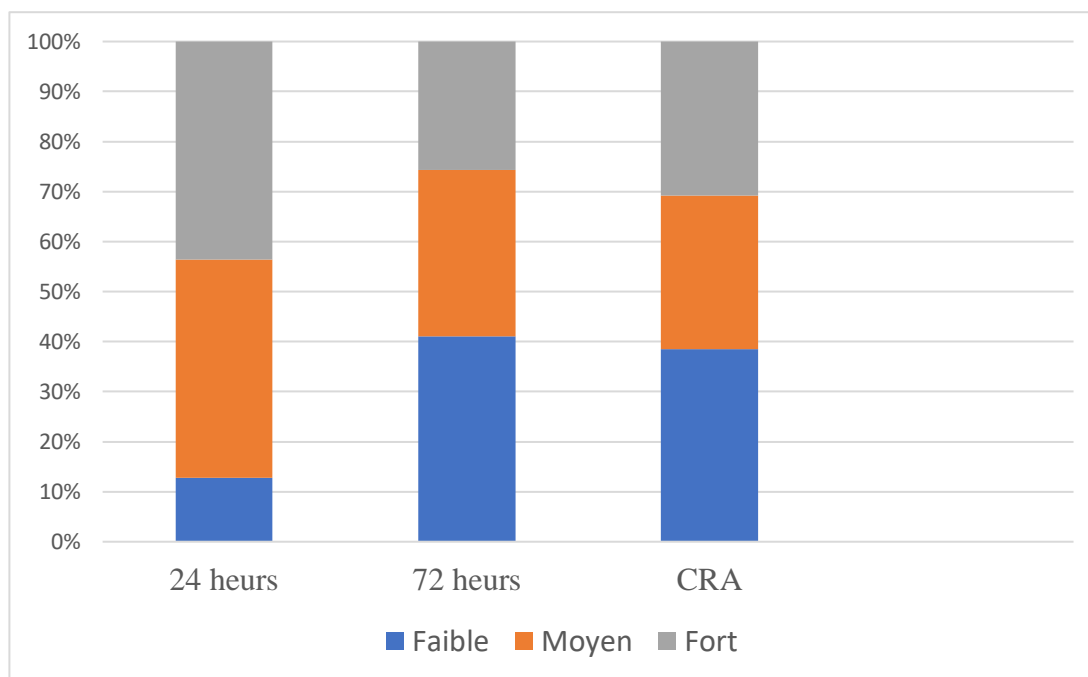
	Comparaison des souches		Comparaison des périodes d'incubation	
	Production de biofilm	DO	Production de biofilm	DO
H de Kruskal-Wallis	3.388	2.398	6.520	11.511
df	1	1	1	1
Sig. asymptotique	0.066	0.121	0.011	0.001
U de Mann-Whitney			520.500	421.000
W de Wilcoxon			1300.500	1201.000
Z			-2.553	-3.393
Sig. asymptotique (bilatérale)			0.011	0.001

Les statistiques descriptives montrent un changement notable dans la distribution des catégories de production de biofilm entre les périodes d'incubation de 24 heures et de 72 heures. Après 24 heures, la majorité des souches étaient des producteurs de biofilms modérés ou forts. Cependant, après 72 heures, le taux de producteurs de biofilms faibles a augmenté de manière significative (**Tableau 5**).

Les données révèlent que la production de biofilm est significativement plus élevée après 24 heures d'incubation (87%) qu'après 72 heures (59%) (**Fig20**). Plus précisément, après 24 heures, il y a une plus grande proportion de producteurs de biofilms modérés et forts, alors qu'après 72 heures, il y a une augmentation notable des producteurs de biofilms faibles et une diminution correspondante des producteurs modérés et forts. Également, les souches *S.aureus* ont montrées une capacité de formation de biofilm plus élevée après 24 heures d'incubation (61% fort et 33% moyen) suivit par les *SCN* (29% fort et 52% moyen), cette répartition a changé avec l'allongement de la période d'incubation, après 72 heures les *SCN* persistaient relativement contrairement à *S.aureus*, dont la formation de biofilms a diminué (**Fig18**).

Tableau 5:Tableau croisé : Les Souches * Production de biofilm * La période d'incubation.

		Production de biofilm			Total N (%)	
		Faible N(%)	Moyen N(%)	Fort N (%)		
La période d'incubation	24 h	<i>S.aureus</i>	1 (5.5%)	6 (33.3%)	11 (61%)	18
		SCN	4(19.04%)	11(52.3%)	6 (28.5%)	21
		Total	5(12.8%)	17(43.5%)	17(43.5%)	39
		La production de biofilm détectée	12.8%	87%		
	72h	<i>S.aureus</i>	7(38.8%)	5(27.7%)	6(33.3%)	18
		SCN	9(42.8%)	8(38%)	4(19%)	21
		Total	16(41%)	13(33.3%)	10 (25.6%)	39
		La production de biofilm détectée	41%	59%		

**Figure 17.** Comparaison de la production de biofilms après 24 et 72 heures d'incubation par méthode MTP et par méthode CRA.

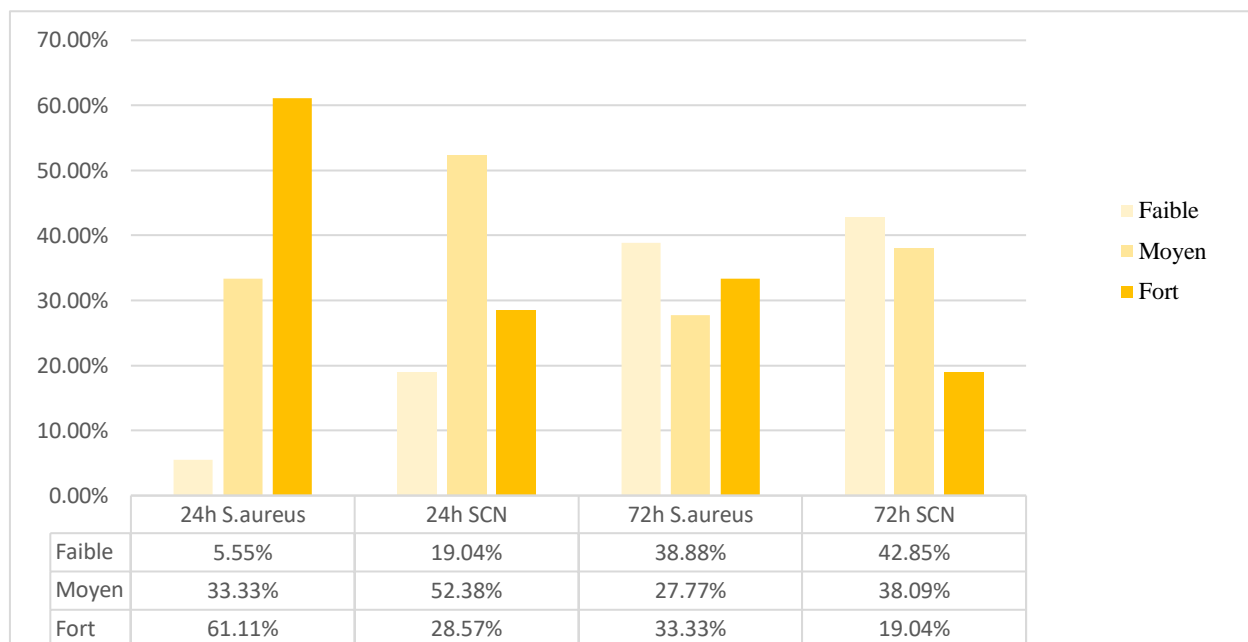


Figure 18. Comparaison de la production de biofilms entre les souches *S. aureus* et *SCN* après 24 et 72 heures d'incubation.

Confirmant ces résultats, *S. aureus* et *SCN* présentent une diminution notable de la production de biofilms entre 24 et 72 heures d'incubation en utilisant la méthode MTP (**Fig19**). Après 24 heures, les deux souches présentaient un taux de production de biofilm positif de 43,5 %. Cependant, après 72 heures, ce taux est tombé à 28,2 % pour *S. aureus* et à 30,7 % pour *SCN*. Ces résultats suggèrent que la formation de biofilms est plus robuste dans les premiers stades de l'incubation pour les deux types de bactéries, avec un déclin significatif au fur et à mesure que le temps d'incubation s'allonge. Ce schéma souligne l'importance d'une détection et d'une intervention précoces pour contrôler la contamination et les infections associées aux biofilms, et met l'accent sur la nécessité d'une surveillance opportune dans les pratiques de sécurité alimentaire et les établissements de soins de santé.

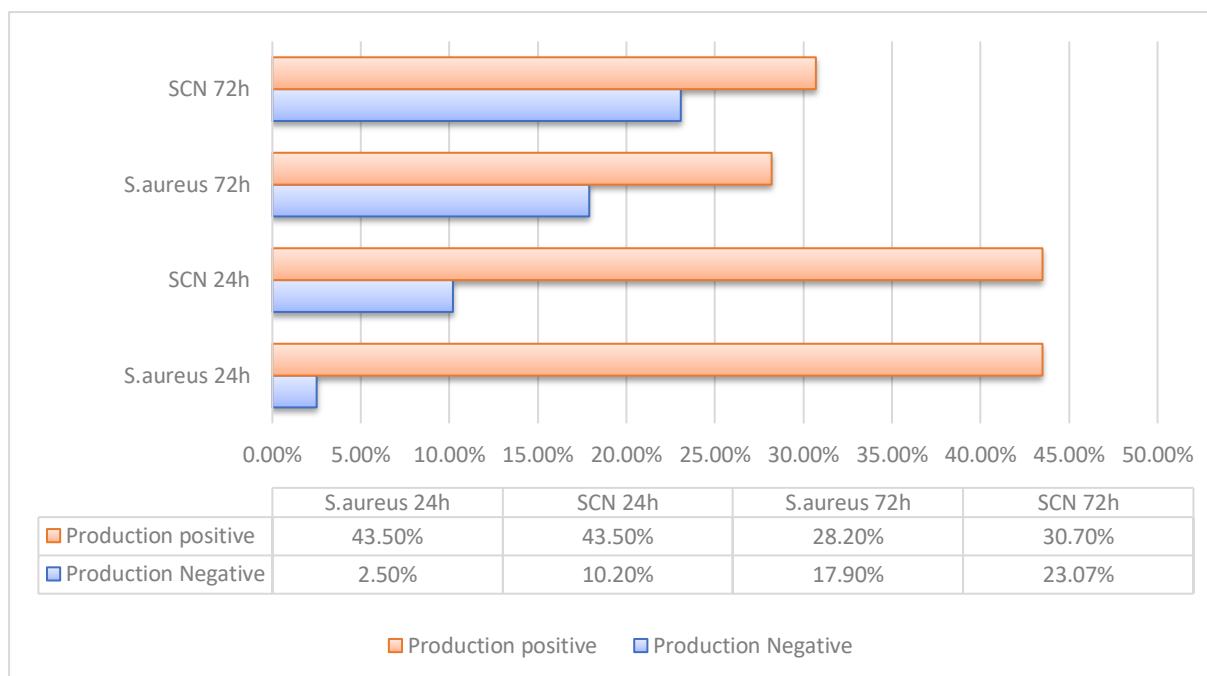


Figure 19. La capacité totale de production des souches avec la méthode MTP après 24h d'incubation et 72h d'incubation.

3. Comparaison des deux méthodes

Étant donné que les hypothèses de normalité des données n'ont pas été respectées, nous avons utilisé le test du rang signé de Wilcoxon pour nos comparaisons.

En utilisant le test de Wilcoxon signé, nous avons cherché à déterminer s'il y avait des différences significatives dans les mesures de production de biofilm entre les méthodes CRA et MTP à différentes périodes d'incubation. Cette comparaison permet de valider la cohérence et la fiabilité des méthodes et donne un aperçu de leur aptitude à évaluer la formation de biofilms dans les souches bactériennes.

- **Comparaison Méthode CRA avec MTP après 24 heures d'incubation :**

L'étude a porté sur 39 souches bactériennes, codées 1 pour *S. aureus* et 2 pour *SCN*. Les résultats de la méthode CRA ont été classés en fonction des phénotypes observés sur le milieu CRA, codés 1 pour une production faible, 2 pour une production modérée et 3 pour une production forte de biofilm. De même, les résultats de la méthode MTP après 24 heures d'incubation ont été classés selon le même schéma de codage. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS.

Selon les résultats obtenus à partir du tableau du test de normalité de Shapiro-Wilk pour la production de biofilm observée par CRA : $Sig < \alpha (0,001)$. Ce résultat indique que les données de production de biofilm observées par la méthode CRA ne suivent pas une distribution normale, ce qui justifie l'utilisation le test non paramétrique du rang signé de Wilcoxon comme un alternatif au paired T test.

Les résultats du test de rang de Wilcoxon donnent un aperçu des différences de production de biofilm observées par les méthodes CRA et MTP après 24 heures d'incubation. L'analyse a révélé que sur les 39 souches bactériennes, 9 ont montré une production de biofilm plus faible avec la méthode MTP qu'avec la méthode CRA. Inversement, 20 souches ont présenté une production de biofilm plus élevée avec la méthode MTP. En outre, 10 souches présentaient des niveaux de production de biofilm égaux dans les deux méthodes. Ces résultats indiquent que la méthode MTP après 24 heures d'incubation mesure généralement une production de biofilms plus élevée que la méthode CRA, ce qui suggère des différences de sensibilité ou de capacité de détection entre les deux méthodes.

Les résultats du test de Wilcoxon signé indiquent qu'il existe une différence significative dans les mesures de production de biofilm entre la méthode CRA et la méthode MTP après 24 heures d'incubation. Plus précisément, la valeur $sig (0,008) < \alpha (0,05)$ et est généralement différente de celle observée par la méthode CRA. Le tableau des rangs (**Tableau 6**) permet de mieux comprendre cette différence. Il y a plus de classements positifs (20) que de classements négatifs (9), ce qui suggère que dans la plupart des cas, la méthode MTP a mesuré une production de biofilm plus élevée que la méthode CRA. Après 24 heures d'incubation, la méthode MTP a montré une production de biofilm significativement plus élevée que la méthode CRA, cela pourrait indiquer une sensibilité ou une capacité de détection différente entre les deux méthodes.

Tableau 6: Test des rangs du Wilcoxon : Production de biofilm observée par Méthode MTP - Production de biofilm observée par Méthode CRA.

		CRAvsMTP24h			CRAvsMTP72h		
		N	Rang moyen	Somme des rangs	N	Rang moyen	Somme des rangs
Production de biofilm observée par Méthode MTP - Production de biofilm observée par Méthode CRA	Rangs négatifs	9 ^a	11.11	100.00	11 ^a	15.05	165.50
	Rangs positifs	20 ^b	16.75	335.00	13 ^b	10.35	134.50
	Ex aequo	10 ^c			15 ^c		
	Total	39			39		

a. Production de biofilm observée par Méthode MTP < Production de biofilm observée par Méthode CRA
 b. Production de biofilm observée par Méthode MTP > Production de biofilm observée par Méthode CRA
 c. Production de biofilm observée par Méthode MTP = Production de biofilm observée par Méthode CRA

- **Rangs négatifs :** Dans ces cas, la production de biofilms observée par la méthode MTP était inférieure à celle observée par la méthode CRA.
- **Rangs positifs :** Dans ces cas, la production de biofilms observée par la méthode MTP était plus importante que celle observée par la méthode CRA.
- **Égalités :** Dans ces cas, la production de biofilm a été la même pour les deux méthodes.
- **Comparaison Méthode CRA avec MTP après 72 heures d'incubation :**

Les résultats du test de Wilcoxon signé ne montrent pas de différence significative dans les mesures de production de biofilm entre les méthodes CRA et MTP après 72 heures d'incubation, comme l'indique la valeur *sig* non significative ($0,645 > \alpha (0.05)$) (**Tableau 6**). Après 72 heures d'incubation, aucune différence significative n'a été observée entre les deux méthodes, suggérant que les évaluations de formation de biofilm deviennent comparables sur une plus longue période.

Dans la présente étude, le pourcentage de production de biofilm détecté par la méthode de la plaque de micro-titration après 24 heures d'incubation (87,17 %) était élevé, suivi de la méthode

de la gélose rouge Congo (61,53 %) et de la méthode de la plaque de micro-titration après 72 heures d'incubation (58,97 %) (**Fig20**).

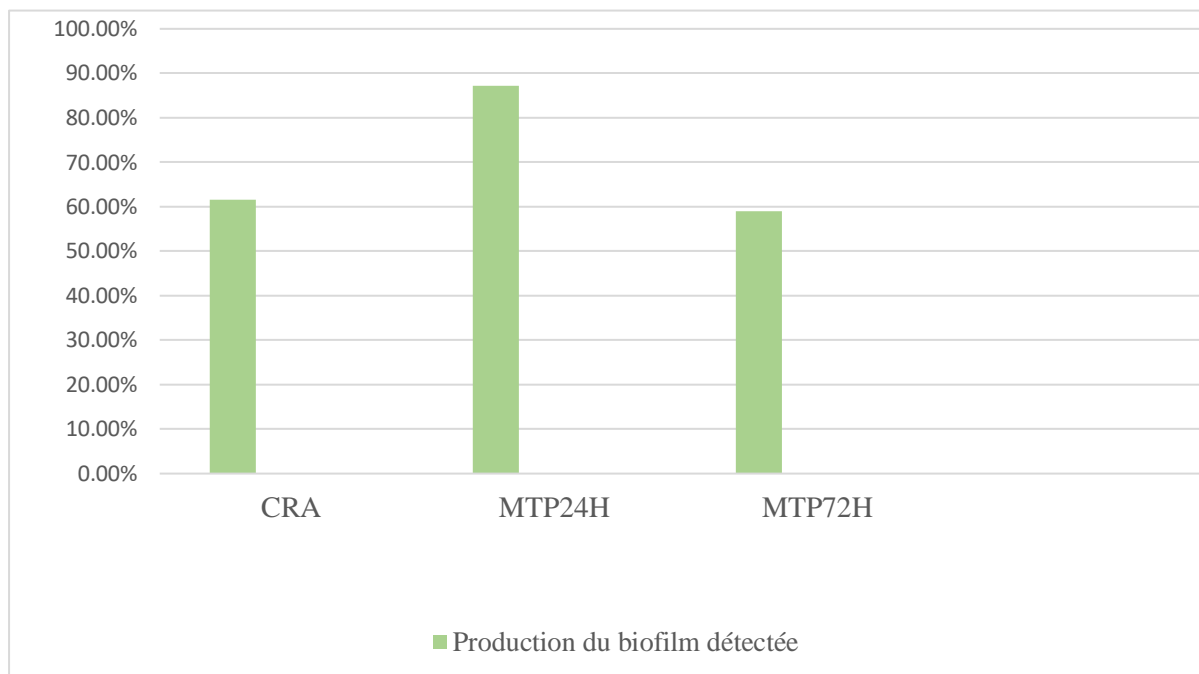


Figure 20. Le pourcentage de production de biofilm détecté par la méthode de la plaque de par la méthode de la plaque de culture tissulaire (après 24 heures d'incubation et 72 heures) et la méthode CRA.

Chapitre 5.

Discussion

Chapitre 5 : Discussion

1. Isolement et Prévalence des Souches

L'isolement sur gélose au sel de mannitol a permis de distinguer deux phénotypes parmi les 39 souches testées : 18 souches ont été identifiées comme *S. aureus* (46 %) en raison de leur capacité à fermenter le mannitol, tandis que 21 souches ont été classées comme staphylocoques à *coagulase négative* (*SCN*, 54 %) en raison de leur incapacité à fermenter le mannitol. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Achek *et al.* (2018), qui ont isolé 51 staphylocoques à partir d'échantillons alimentaires, dont 33 *S. aureus* et 18 *SCN*, soulignant une présence substantielle des deux types dans les sources alimentaires. De même, Safarpour Dehkordi *et al.* (2017) ont rapporté une prévalence de 9,69 % de *S. aureus* dans des barbecues de viande et de poulet, dont 7,62 % étaient des *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM), indiquant des niveaux de contamination notables dans les produits alimentaires.

Benjelloun Touimi *et al.* (2020) ont étudié la présence de *S. aureus* et de *SCN* dans la cuisine d'un hôpital marocain, rapportant une prévalence de 17,33 % pour *S. aureus* et de 23,33 % pour *SCN* sur les aliments et les surfaces de contact, ce qui suggère l'ubiquité de ces bactéries dans les environnements liés à l'alimentation. Paharik et Horswill (2016) ont souligné le potentiel pathogène de diverses espèces de staphylocoques, y compris les *SCN*, dans les infections associées aux soins de santé et les infections intra-mammaires bovines, soulignant leur pertinence clinique. Les résultats de Benjelloun Touimi *et al.* (2020) indiquant des taux de prévalence élevés des staphylocoques à *coagulase négative* (*SCN*) chez les personnes manipulant des aliments, avec 60 % de portage sur les mains et 66,67 % de colonisation nasale, suggèrent des implications significatives pour la sécurité alimentaire, en particulier dans les établissements de restauration de rue. Les *SCN* font généralement partie du microbiote de la peau humaine et peuvent contaminer les aliments de manière opportuniste au cours des processus de manipulation (**Huebner *et al.*, 1999 ; Becker *et al.*, 2014**). La prévalence relativement plus élevée de *SCN* par rapport à *Staphylococcus aureus* chez les manipulateurs d'aliments souligne leur rôle potentiel en tant que contaminants dans les échantillons d'aliments vendus sur la voie publique.

Mubarak (2021) a fait état de résultats surprenants, révélant une prévalence significative de *Staphylococcus spp.* dans les marchés de détail de la viande et des produits laitiers. Notamment, *S. aureus* était absent parmi les espèces identifiées. Sur 90 échantillons testés, 30 (33,3 %) contenaient

des *SCN*. Mubarak a relié ces résultats à d'autres études, suggérant que la prévalence élevée de *SCN* pourrait résulter d'une mauvaise hygiène pendant la production ou après la distribution.

Contredisant nos résultats, **Gundogan *et al.* (2005)** ont signalé une fréquence élevée d'isolement de *S. aureus* dans des échantillons de viande et de poulet crus, la contamination étant souvent introduite par des travailleurs infectés.

2. Méthode qualitative CRA

Parmi les souches de *S. aureus*, la répartition des producteurs de biofilms faibles et forts/moyens était égale (23,07 %). Pour les *SCN*, les producteurs de biofilms forts/moyens étaient plus nombreux (38,46 %) que les producteurs faibles (15,38 %). Bien que les souches de *SCN* aient montré une plus grande propension à la production de biofilms que *S. aureus*, les tests statistiques n'ont pas révélé de différence significative entre les deux groupes. Bose *et al.* (2009) ont constaté que 44,69 % des isolats de staphylocoques (coagulase négative) provenant d'échantillons cliniques produisaient des biofilms, contre 32,96 % des isolats de *S. aureus*, indiquant une plus grande propension à la formation de biofilms parmi les *SCN*.

Iorio *et al.* (2011) ont analysé des hémocultures et ont constaté que 15 % des isolats de *S. aureus* étaient CRA positifs après 24 heures sans glucose, et que ce chiffre passait à 27,5 % avec du glucose. Pour *S. epidermidis*, 41,7 % étaient CRA positifs. Thilakavathy *et al.* (2015) ont constaté que 39,58 % des isolats de *SCN* étaient des producteurs de biofilms, en corrélation avec d'autres études montrant un pourcentage similaire. Rampelotto *et al.* (2018) ont rapporté que 42 % de 176 isolats de *SCN* étaient positifs sur CRA, et Paluch-Oleś *et al.* (2011) ont constaté que 36,7 % des isolats de *SCN* étaient positifs sur CRA, ce qui démontre encore les capacités de production de biofilms des *SCN* et confirme les résultats présentés dans cette étude.

Les souches de *SCN* présentaient une plus grande propension à la production de biofilms comparées aux souches de *S. aureus*. Ces résultats suggèrent que les souches isolées à partir d'échantillons d'aliments vendus sur la voie publique peuvent présenter un risque plus élevé de problèmes liés aux biofilms, contribuant potentiellement à une contamination persistante et à une résistance accrue aux efforts de nettoyage et d'assainissement.

Bien que les *SCN* soient généralement moins pathogènes que *S. aureus*, ils présentent toujours des risques de maladies d'origine alimentaire, en particulier si les pratiques d'hygiène adéquates ne sont pas strictement respectées. Ces résultats soulignent l'importance de mesures d'hygiène rigoureuses

et de programmes de surveillance pour réduire le risque de contamination microbienne dans les aliments vendus sur la voie publique, afin de garantir la sécurité de la santé publique.

La comparaison des résultats avec ceux d'Oliveira et Cunha (2010) révèle des différences nuancées dans l'interprétation des résultats de la gélose au rouge Congo (CRA) parmi les isolats staphylococciques. Oliveira et Cunha se sont concentrés sur les staphylocoques à *coagulase négative* (SCN), où ils ont identifié 73 isolats sur 100 formants des colonies noires sur la gélose au rouge Congo, classées en colonies noir brillant et noires sèches.

En revanche, les résultats de cette étude examinent à la fois des souches de *S. aureus* et de SCN, et 61,53 % des souches ont démontré une production positive de biofilms (catégories forte et moyenne) en utilisant la méthode CRA. Ces résultats corroborent les données de recherches antérieures, notamment Gajewska et Chajęcka-Wierzchowska (2020) et Sultan et Nabel (2019), qui ont également mis en évidence un taux de détection des biofilms de plus de 50 % avec la méthode CRA. La catégorisation dans cette étude permet de classer les fabricants de biofilms en fonction de la teinte et de la forme des colonies, incluant les couleurs rouge bordeaux, noires et rouges sur des milieux gélosés particuliers. Cette approche diffère légèrement de la méthode d'Oliveira et Cunha, qui se concentre principalement sur les colonies noires et leurs variantes.

2.1. La relation entre la formation du Slime et la production du biofilm

Le terme « Slime » était employé dans la littérature précédente pour désigner la muqueuse des colonies de souches staphylococciques, le film visqueux qui recouvre les parois des tubes de culture et la matrice extracellulaire qui recouvre la surface des cathéters. D'un point de vue rétrospectif, ce « mucus » était très probablement une *PIA* dans la majorité des cas (Götz, 2002). Selon Aparna et Yadav (2008), l'une des caractéristiques des biofilms staphylococciques est la production d'une substance visqueuse connue sous le nom de *PIA* (polysaccharide intercellular adhesin). Le *PIA* est un polysaccharide composé de *N-acétylglucosamines* liées en *bêta-1,6* avec des résidus partiellement diacétylés. Cette substance intègre et protège les cellules bactériennes contre les défenses immunitaires de l'hôte et les traitements antibiotiques, ce qui rend les infections associées aux biofilms particulièrement difficiles à traiter. Les souches *PIA* positives et *PIA* négatives peuvent être différenciées à l'aide de la gélose au rouge Congo. Sur ce milieu, les colonies des souches *PIA* positives apparaissent noires, tandis que les colonies des souches *PIA* négatives sont rouges (Götz, 2002).

L'une des souches qui présentait des colonies noires sur la gélose au rouge Congo (CRA) a été classée comme un producteur de biofilm faible/non-productrice en utilisant la méthode de la plaque de micro-titration. Ce résultat est conforme aux observations de Hall-Stoodley *et al.* (2004), qui ont noté que les souches possédant l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA) et le groupe de gènes d'adhésion intercellulaire (*ica*) pouvaient néanmoins ne pas former de biofilms si elles étaient défectueuses au niveau de l'adhérence initiale. L'étape de l'adhésion initiale est multifactorielle, influencée par les propriétés physicochimiques du matériau polymère biomédical et la nature de la surface des cellules bactériennes. Plus précisément, l'hydrophobie et la charge électrostatique du matériau jouent un rôle crucial dans les interactions entre le polymère et la surface de la cellule bactérienne. Cette divergence entre les résultats de CRA et les essais sur plaques de micro-titration souligne la complexité de la formation des biofilms et la nécessité de disposer de plusieurs méthodes pour évaluer avec précision les capacités de production de biofilms (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Darwish et Asfour (2013) ont classé la production de biofilm en fonction de la morphologie et de la couleur des colonies sur CRA, les colonies cristallines noires et sèches étant considérées comme des indicateurs positifs de la production de bave. En revanche, la présente étude se basait sur des critères de catégorisation légèrement différents, distinguant les producteurs faibles/non-producteurs de biofilm par des colonies rouges et visqueuses sur un milieu rouge et des colonies rouges et sèches sur un milieu rouge. Les producteurs forts/modérés ont été identifiés par des colonies rouge bordeaux sur un milieu rouge foncé, des colonies noires sur un milieu rouge, des colonies rouges sur un milieu noir, des colonies noires sur un milieu rouge foncé et des colonies noires sur un milieu noir. Cette approche s'aligne sur les critères établis par des chercheurs antérieurs comme Dubravka *et al.* (2010), où la morphologie et la consistance des colonies jouent un rôle crucial dans la catégorisation des capacités de production de biofilms. Malgré ces variations méthodologiques, les études soulignent la variabilité des capacités de formation de biofilms parmi les souches de *S. aureus* et de *SCN* isolées de différentes sources, ce qui met en évidence le besoin de méthodes normalisées pour évaluer avec précision la production de biofilms parmi les différentes espèces et souches de *Staphylococcus*.

Malgré les différences observées dans les phénotypes de production de biofilms, le test statistique du chi-carré n'a pas montré de différence significative entre *S. aureus* et *SCN* en termes de capacités de formation de biofilms. Cela pourrait indiquer que la taille de l'échantillon (39

souches) n'était pas suffisante pour détecter des différences subtiles dans la formation de biofilms entre *S. aureus* et *SCN*. Cependant, la méthode CRA, bien que largement utilisée, pourrait ne pas saisir tous les aspects de la formation du biofilm qui permettraient de distinguer *S. aureus* et *SCN*, et des recherches futures pourraient élargir la taille des échantillons.

Les résultats indiquent que la production de biofilm entre *S. aureus* et *SCN* n'est pas significativement différente, mais que la production de biofilm et les valeurs de densité optique (DO) sont significativement différentes entre les deux périodes d'incubation (24 heures vs. 72 heures), avec une formation de biofilm plus élevée après 24 heures (87 %) par rapport à 72 heures (59 %). De plus, la comparaison des méthodes a montré que le test MTP détectait une production de biofilm plus élevée que la méthode CRA après 24 heures.

Cela est en accord avec les résultats d'études comme Oliveira et Cunha (2010) et Darwish et Asfour (2013), où les deux pathogènes ont démontré des niveaux de production de biofilms variables, sans aucune domination claire de l'une ou l'autre espèce. Les réponses différentes de *S. aureus* et de *SCN* dans l'étude actuelle suggèrent en outre des stratégies spécifiques aux espèces dans la formation de biofilms, potentiellement influencées par des facteurs environnementaux et des caractéristiques génétiques, résultats également observés par Revdiwala *et al.* (2012).

1. Effet de la période d'incubation (24 vs. 72 heures)

Dans cette étude, les résultats montrent des différences significatives dans la production de biofilm et les valeurs de DO entre les périodes d'incubation de 24 et 72 heures, confirmées par le test de Kruskal-Wallis. La production de biofilm était notablement plus élevée après 24 heures (87%) qu'après 72 heures (59%). Tsai et Smith (1988) ont employé la technique de la plaque de micro-titration pour mesurer la production de glycocalyx chez 15 souches de *S. epidermidis* après 24 et 48 heures d'incubation. Malgré l'absence de différence significative entre les deux périodes d'incubation en ce qui concerne la production de biofilm *glycocalyx*, une substance visqueuse semblable à de la colle sécrétée par les bactéries qui les aide à adhérer aux surfaces et à former une barrière protectrice (Erlandsen *et al.*, 2004), l'étude de Tsai *et al.* (1988), a classé les souches de *S. epidermidis* en producteurs de *glycocalyx* élevés, moyens et faibles, avec une certaine persistance de cette classification indépendamment de la période d'incubation.

De plus, les souches de *S. aureus* ont montré une capacité initiale plus élevée à former des biofilms après 24 heures d'incubation (61% fort et 33% moyen), suivies par les *SCN* (29% fort et

52% moyen), avec une distribution qui a évolué différemment après 72 heures, où les *SCN* ont maintenu une capacité relative de formation de biofilm tandis que celle de *S. aureus* a diminué. Les résultats de l'étude menée par Iorio *et al.* (2011) complètent nos observations ; leurs résultats montrent que la méthode MPA (Micro-Plate Assay) a détecté une proportion significative de biofilms chez *S. aureus*, avec une répartition similaire entre producteurs forts, modérés et faibles. Ils ont également noté des différences dans la détection du biofilm entre les souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* (*SCN*), soulignant l'impact de l'incubation prolongée sur milieu CRA et de l'environnement nutritif sur la formation de biofilm.

En revanche, Mulla et Revdiwala (2011) ont étudié la formation de biofilms en milieu clinique à l'aide d'une approche MTP similaire, en se concentrant sur des cultures bactériennes provenant de dispositifs médicaux. Leurs conclusions soulignent que la majorité des isolats testés (88 %) sont capables de former des biofilms, avec une période d'incubation optimale de 16 à 20 heures. En outre, la présence de glucose a considérablement augmenté la production de biofilms, ce qui indique le rôle critique de la disponibilité des nutriments dans le développement des biofilms. L'observation de la diminution de la production de biofilms au cours des 72 heures de l'étude actuelle s'aligne sur les résultats de Mulla et Revdiwala (2011) selon lesquels la formation de biofilms atteint souvent des sommets au cours de fenêtres d'incubation spécifiques, influencées par la disponibilité des nutriments et l'adhérence des bactéries aux surfaces.

Dans l'étude d'Agarwal *et al* (2011), portant sur des souches de *Salmonella*, ils ont observé un pic de production de biofilms de 76,82 % après 48 heures d'incubation en utilisant le test de la plaque de micro-titration (MTP). Les périodes d'incubation prolongées au-delà de 48 heures, comme le montre la comparaison de l'étude présente après 72 heures, montrent souvent un déclin ou une stabilisation de la production de biofilms. Cela peut refléter divers facteurs tels que l'épuisement des nutriments, la maturité du biofilm entraînant sa dispersion, un processus régulé qui implique la dégradation de la matrice EPS, ou l'adaptation des bactéries à l'environnement. Par exemple, après une phase initiale de formation du biofilm, certaines bactéries peuvent entrer dans une phase de dispersion où elles développent le phénotype planctonique et quittent le biofilm. Cela commence plusieurs jours après le stade IV du développement du biofilm, ce qui entraîne une réduction de la biomasse globale du biofilm au fil du temps (**Koo *et al.*, 2017 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Aparna et Yadav, 2008**).

3. Comparaison des méthodes de détection (CRA vs. MTP)

La comparaison de la méthode CRA avec la méthode de la plaque de micro-titration (MTP) après 24 heures d'incubation a révélé des différences significatives dans les mesures de production de biofilm. En général, la méthode MTP a tendance à détecter une production de biofilm plus élevée pour la plupart des souches bactériennes testées par rapport à la méthode CRA. Cette disparité suggère des variations potentielles de sensibilité ou de capacité de détection entre les deux méthodes. Inversement, après 72 heures d'incubation, la comparaison entre les méthodes CRA et MTP n'a montré aucune différence significative dans les mesures de production de biofilm, ce qui indique des évaluations comparables sur une période d'incubation plus longue. Ce résultat souligne l'influence de la durée d'incubation sur la maturation du biofilm et la stabilité des méthodes de détection dans le temps.

Contrairement aux résultats observés dans la présente étude, l'étude de Hassan *et al.* (2011) après 24 heures d'incubation, 22,7 % des isolats cliniques sont considérés comme des producteurs élevés de biofilms et 41 % comme des producteurs modérés de biofilms en utilisant la méthode MTP. En revanche, la méthode CRA n'a permis de détecter que 3,63 % d'isolats positifs pour la production de biofilms parmi 110 échantillons cliniques. Les différences de taux de détection entre les méthodes CRA et MTP observées dans notre étude par rapport à Hassan *et al.* (2011) pourraient provenir de différences dans les souches bactériennes (origines alimentaires et des isolats cliniques), les conditions d'incubation (24 heures d'incubation par ailleurs dans l'étude présente l'incubation de CRA a été pour 48 heures) ou les propriétés inhérentes aux tests de détection utilisés. Les mêmes résultats ont été présentés par Mathur *et al.* (2006), la méthode de la plaque tissulaire recommandée comme la méthode la plus sensible, plus précise et la plus reproductible pour détecter la formation de biofilms par les staphylocoques, CRA présentant une mauvaise corrélation avec les méthodes MTP /TCP et TM.

En ce qui concerne des périodes plus longues d'incubation, une étude menée par González-Machado *et al.* (2018) a examiné la formation de biofilm chez *Salmonella enterica* sérotype Agona sur des surfaces en polystyrène sur une période de 144 heures en utilisant la microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Leurs résultats ont montré que le biovolume du biofilm atteignait un pic à 72 heures, suivi d'une diminution, avec une baisse constante du biovolume des cellules vivantes au fil du temps. Cela suggère que les méthodes qui fournissent une quantification du biofilm sont les meilleures, les plus précises et les plus sensibles pour détecter le biofilm aux premiers stades

de développement. La plupart des études, telles que celles de Basnet *et al.* (2023), Mathur *et al.* (2006), Manandhar *et al.* (2021), Thilakavathy *et al.* (2015), et Arciola *et al.* (2002), ont montré que la méthode CRA est probablement moins sensible que la méthode MTP et d'autres méthodes, et ne peut pas être considérée comme fiable pour être utilisée seule dans la détection des biofilms. Elle est mieux utilisée comme méthode complémentaire combinée à une méthode plus sensible comme référence. La sensibilité de la méthode CRA peut également être améliorée avec des protocoles modifiés, comme ceux utilisés dans l'étude de Iorio *et al.* (2011) avec l'ajout de différentes concentrations de glucose et l'observation des résultats, ou comme prévu dans la présente étude en prolongeant la période d'incubation (48h). La méthode CRA dans cette étude a montré des résultats relativement similaires à la méthode MTP après 72 heures d'incubation, ce qui prouve encore que des périodes d'incubation prolongées dans la méthode MTP diminuent sa sensibilité.

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de production de biofilms des souches de *S.aureus* et staphylocoques à *coagulase négative* (*SCN*) isolées des aliments de rue en utilisant deux méthodes : la gélose rouge Congo (CRA) et la plaque de micro-titration (MTP). Nous avons comparé ces méthodes pour déterminer leur sensibilité et évaluer l'impact de différentes conditions d'incubation sur les résultats.

Parmi les 39 souches isolées, 61,53 % présentaient un phénotype positif de formation de biofilm, dont 38,46 % étaient des *SCN*. Le test du chi carré n'a pas montré de différence significative dans la capacité de formation de biofilm entre *SCN* et *Staphylococcus aureus*. La méthode MTP a révélé une production de biofilm significativement plus élevée après 24 heures d'incubation (87 %) qu'après 72 heures (59 %).

Après 24 heures, la méthode MTP a détecté un niveau de production de biofilm significativement plus élevé (87,17 %) que la méthode CRA (61,53 %). Cependant, après 72 heures, les résultats des deux méthodes étaient comparables. Cela indique que la méthode MTP est plus sensible pour les premières phases de formation de biofilm, tandis que les deux méthodes deviennent similaires sur des périodes d'incubation plus longues.

Ces résultats soulignent l'importance des méthodes quantitatives comme la MTP pour la recherche sur les biofilms. La détection précoce des biofilms est cruciale pour améliorer les pratiques de sécurité alimentaire, car elle peut prévenir l'établissement de communautés bactériennes persistantes. Les technologies émergentes, comme les plateformes micro-fluidiques, offrent des perspectives prometteuses pour la surveillance en temps réel des biofilms dans des environnements complexes, améliorant notre compréhension et notre capacité à gérer les biofilms de manière plus efficace.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Achek, R., Hotzel, H., Cantekin, Z., Nabi, I., Hamdi, T. M., Neubauer, H., & El-Adawy, H. (2018). Emerging of antimicrobial resistance in *staphylococci* isolated from clinical and food samples in Algeria. BMC research notes, 11, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3762-2>.
- Agarwal, R. K., Singh, S., Bhilegaonkar, K. N., & Singh, V. P. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. International Food Research Journal, 18(4), 1493.
- Anacarso, I., Condò, C., Sabia, C., Messi, P., Niederhausern, S. D., Bondi, M., & Iseppi, R. (2013). Antimicrobial resistance and other related virulence factors in *staphylococcus spp* isolated from food, environmental and humans in Italy. Universal Journal Microbiology Research, 1(1), 1-9. DOI: 10.13189/ujmr.2013.010101.
- Aparna, M. S., & Yadav, S. (2008). Biofilms: microbes and disease. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 12, 526-530. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000600016>.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., & Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica locus*. Biomaterials, 23(21), 4233-4239.

B

- Basnet, A., Tamang, B., Shrestha, M. R., Shrestha, L. B., Rai, J. R., Maharjan, R., ... Nitzsche-Bell, M. (2023). Assessment of four in vitro phenotypic biofilm detection methods in relation to antimicrobial resistance in aerobic clinical bacterial isolates. PLoS ONE, 18(11), e0294646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294646>.

- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). *Coagulase-Negative Staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. doi: 10.1128/CMR.00109-13.
- Benjelloun Touimi, G., Bennani, L., Berrada, S., Moussa, B., & Bennani, B. (2020). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus sp.* isolated from food, food contact surfaces, and food handlers in a Moroccan hospital kitchen. *Letters in Applied Microbiology*, 70(4), 241–251. <https://doi.org/10.1111/lam.13278>.
- Bose, S., Khodke, M., Basak, S., & Mallick, S. K. (2009). Detection of biofilm producing *staphylococci*: need of the hour. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3, 1915-1920.
- BOUKERA ABBACI Yazid, D. N. (2019). Etude du potentiel de formation du biofilm par les Staphylocoques isolés des infections animales et humaines.

C

- Chaalal, W. (2013). Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Faculté des Sciences. Université d'Es-Senia Oran, Algérie. 94p.
- Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. *Pseudomonas Methods and Protocols*, 631–641. doi:10.1007/978-1-4939-0473-0_48.

D

- Darwish, S. F., & Asfour, H. A. (2013). Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/378492>.
- Davey, M. E., & O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.4.847-867.2000>.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.

- Dubravka, M., Lazić, S., Branka, V., Jelena, P., Bugarski, D., & Zorica, Š. (2010). Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Veterinaria*, 60(2-3), 217–226. <https://doi.org/10.2298/AVB1003217M>.

E

- Erlandsen, S. L., Kristich, C. J., Dunny, G. M., & Wells, C. L. (2004). High-resolution visualization of the microbial *glycocalyx* with low-voltage scanning electron microscopy: Dependence on cationic dyes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(11), 1427–1435. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6428.2004>.

F

- Fairbrother, R. W. (1940). Coagulase Production as a Criterion for the Classification of the *Staphylococci*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 1940, Vol. 50, 83-88.
- 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(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.
- Fleurette, J. (1990). Taxonomie et ecologie des staphylocoques coagulase négatifs. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 20, 6–15. [https://doi.org/10.1016/s0399-077x\(05\)81083-2](https://doi.org/10.1016/s0399-077x(05)81083-2).
- Foster, T. (1996). *Staphylococcus*. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed., Chp. 12). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by *coagulase negative staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.
- Fauchère, J. L., & Avril, J. L. (2002). *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses.

G

- 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. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080654>.

- Goetz, C., Tremblay, Y. D., Lamarche, D., Blondeau, A., Gaudreau, A. M., Labrie, J., Jacques, M. (2017). *Coagulase-negative staphylococci* species affect biofilm formation of other *coagulase-negative* and *coagulase-positive staphylococci*. *Journal of dairy science*, 100(8), 6454-6464. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12629>.
- González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., & Alonso-Calleja, C. (2018). Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella Agona* biofilms at different stages of development. *PLOS ONE*, 13(7), e0200011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200011>.
- Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1367–1378. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02827.x>.
- Guiraud, J. P., & Rosec, J. P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire* (Vol. 300). Afnor.
- Gundogan, N., Citak, S., Yucel, N., & Devren, A. (2005). A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Science*, 69(4), 807–810. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.10.011>.

H

- Halim, R. M. A., Kassem, N. N., & Mahmoud, B. S. (2018). Detection of biofilm producing *staphylococci* among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(8), 1335. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.246>.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305–311. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702011000400002>.
- Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A., & Fluit, A. C. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of *coagulase-*

negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2286–2290. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.5.2286-2290.2005>.

- Huebner, J. D., & Goldmann, D. A. (1999). *Coagulase-negative staphylococci*: Role as pathogens. *Annual Review of Medicine*, 50(1), 223–236. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.50.1.223>.

I

- Iorio, N. L. P., Lopes, A. P. da C. N., Schuenck, R. P., Barcellos, A. G., Olendzki, A. N., Lopez, G. L., & dos Santos, K. R. N. (2010). A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. *Microbiology and Immunology*, 55(1), 28–33. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00288.x>.
- Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Coagulase-negative staphylococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.016>.

K

- Kloos, W. E., & Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of *coagulase-negative staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(1), 117–140. <https://doi.org/10.1128/cmr.7.1.117>.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 740–755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>.

L

- Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2011). *Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory* (4th ed.). Morton. ISBN: 978-089582-872-9.

M

- Manandhar, S., Singh, A., Varma, A., Pandey, S., & Shrivastava, N. (2021). Phenotypic and genotypic characterization of biofilm producing clinical *coagulase negative staphylococci*

from Nepal and their antibiotic susceptibility pattern. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00447-6>.

- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D., 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), 25–29. [https://doi.org/10.1016/s0255-0857\(21\)02466-x](https://doi.org/10.1016/s0255-0857(21)02466-x).
- Mauline, L. (2012). Elaboration de nanoparticules de silice bifonctionnelles : outils innovants pour l'exploration de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*.
- Mounier, M., Pestourie, N., Ploy, M.-C., & Denis, F. (2009). Les détergents et les désinfectants : Les risques liés à l'usage médical des biocides (2e partie). *Antibiotiques*, 11(4), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2009.07.001>.
- Mubarak, A. (2021). Prevalence and genetic diversity of *coagulase-negative Staphylococcus* in food products collected from Riyadh region. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15, 1987-1995. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.4.20>.
- Mulla, S. A., & Revdiwala, S. (2011). Assessment of biofilm formation in device-associated clinical bacterial isolates in a tertiary level hospital. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 54(3), 561-564. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.85093>.

O

- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>.
- Oliveira, A., & Cunha, M. de L. R. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in *coagulase-negative staphylococci*. *BMC Research Notes*, 3(1), 260. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-260>.
- Orenstein, A. (2011). The discovery and naming of *Staphylococcus aureus*. Periodical [http://www.antimicrobe.org/].

P

- Paharik, A. E., & Horswill, A. R. (2016). The Staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (pp. 529–566). <https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch19>.
- Paluch-Oleś, J., Magryś, A., Koziół-Montewka, M., Niedzielski, A., Niedźwiadek, J., Niedzielska, G., & Kotowski, M. (2011). The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of *coagulase-negative staphylococci* isolates in children with otitis media. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 75(1), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2010.10.025>.
- Ploy, M. C., Poyart, C., Cattoir, V., Denis, F., & Martin, C. (2016). *Bactériologie médicale: Techniques usuelles* (3rd ed.). Elsevier Health Sciences.

R

- Rampelotto, R. F., Lorenzoni, V. V., Silva, D. da C., Coelho, S. S., Wust, V., Garzon, L. R., ... Hörner, R. (2018). Assessment of different methods for the detection of biofilm production in *coagulase-negative staphylococci* isolated from blood cultures of newborns. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(6), 761–767. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0171-2018>.
- Revdiwala, S., Rajdev, B. M., & Mulla, S. (2012). Characterization of bacterial etiologic agents of biofilm formation in medical devices in critical care setup. *Critical Care Research and Practice*, 2012, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2012/945805>.
- Rewatkar, A. R., & Wadher, B. J. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* - Biofilm formation methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 8*(5)*, 36-40.
- Rohinishree, Y. S., & Negi, P. S. (2011). Detection, identification and characterization of *staphylococci* in street vend foods. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 304-313. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.24044>.

S

- Safarpour Dehkordi, F., Gandomi, H., Basti, A. A., Misaghi, A., & Rahimi, E. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospital food. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0257-1>.
- Sambanthamoorthy, K. (2007). Role of *msa* in the regulation of virulence and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. The University of Southern Mississippi.
- Setiabudy, M., Masyeni, D. A. P. S., Indraningrat, A. A. G. I., *et al.* (2023). Biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus*. *Folia Medica Indonesiana*, 59(3), 222-228. <https://doi.org/10.20473/fmi.v59i3.44598>.
- Shields, P., & Tsang, A. Y. (2006). Mannitol salt agar plates protocols. Available from the MicrobeLibrary website: <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Mannitol-Salt-Agar-Plates-Protocols.pdf?ext=.pdf>.
- Sultan, A. M., & Nabel, Y. (2018). Tube method and Congo red agar versus tissue culture plate method for detection of biofilm production by uropathogens isolated from midstream urine: Which one could be better? *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 20(1), 60. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v20i1.9>.
- Sutherland, I. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02012-1).

T

- Thilakavathy, P., Priyan, R. M., Jagatheeswari, P. A., Charles, J., Dhanalakshmi, V., Lallitha, S., Rajendran, T., & Divya, B. (2015). Evaluation of Ica gene in comparison with phenotypic methods for detection of biofilm production by *coagulase negative staphylococci* in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(8), DC16-DC19. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11725.6371>.
- Tsai, C.-L., Schurman, D. J., & Smith, R. L. (1988). Quantitation of glycocalyx production in *coagulase-negative Staphylococcus*. *Journal of Orthopaedic Research*, 6(5), 666–670. <https://doi.org/10.1002/jor.1100060507>.

V

- Veras, J. F., do Carmo, L. S., Tong, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., dos Santos, D. A., ... Jett, M. (2008). A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(4), 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.018>.

Y

- Yuan, L., Straub, H., Shishaeva, L., & Ren, Q. (2023). Microfluidics for Biofilm Studies. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 16, 139-159. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-091522-103827>.

Z

- Zadoks, R., & Watts, J. (2009). Species identification of *coagulase-negative staphylococci*: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.012>

Résumés

Résumés

ملخص

أصبحت المكورات العنقودية سلبية التخثر (*SCN*)، المتعايشة مع جلد الإنسان والأنف، من مسببات الأمراض المهمة بفضل قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية ومقاومة المضادات الحيوية. تزيد هذه الأغشية الحيوية من خطر تلوث الأغذية، وتقلل من مدة صلاحيتها وتسهل انتقال الأمراض. في هذه الدراسة، تم تحليل 39 عينة *SCN* معزولة من أغذية الشوارع لقدرتها على إنتاج الأغشية الحيوية باستخدام طريقة CRA (Congo Red Agar) وMTP (Micro-titer Plate) طريقة CRA الحضانة، وانخفضت إلى 58.97% بعد 72 ساعة. أظهرت سلالات المكورات العنقودية الذهبية قدرة أكبر على تكوين الأغشية الحيوية بعد 24 ساعة (61% قوية، 33% متوسطة) مقارنة مع *SCN* (29% قوية، 52% متوسطة). بعد 72 ساعة، ظلت قدرة *SCN* على تكوين الأغشية الحيوية ثابتة، بينما انخفضت قدرة *S. aureus*. وتشير النتائج إلى أن طريقة الخطة المتوسطة الأجل أكثر موثوقية وكمية من طريقة CRA، ولذلك يوصى باستخدامها في المختبر. في الختام، فإن وجود *SCN* في الغذاء يتطلب اتخاذ تدابير سلامة صارمة للحد من وجودها ومنع المخاطر على صحة المستهلك.

الكلمات المفتاحية: إنتاج الأغشية الحيوية، المكورات العنقودية السلبية المخثرة، المكورات العنقودية الذهبية، الطريقة، أغذية الشوارع.

Résumé

Les staphylocoques à *coagulase négative* (*SCN*), commensaux de la peau humaine et des narines, sont devenus des agents pathogènes importants grâce à leur capacité à former des biofilms et à résister aux antibiotiques. Ces biofilms augmentent le risque de contamination des aliments, réduisent la durée de conservation et facilitent la transmission des maladies. Dans cette étude, 39 échantillons de *SCN* isolés à partir d'aliments vendus sur la voie publique ont été analysés pour leur capacité à produire des biofilms à l'aide des méthodes de la gélose rouge Congo (CRA) et de la plaque de micro-titration (MTP). La méthode CRA a permis d'identifier 61,53 % des isolats comme producteurs de biofilms, tandis que la méthode MTP a permis de détecter 87,18 % des isolats après 24 heures d'incubation, pourcentage qui est tombé à 58,97 % après 72 heures. Les souches de *Staphylococcus aureus* ont montré une plus grande capacité à former des biofilms après 24 heures (61 % forte, 33 % moyenne) par rapport à *SCN* (29 % forte, 52 % moyenne). Après 72 heures, la capacité de formation de biofilms du *SCN* est restée constante, tandis que celle de *S. aureus* a diminué. Les résultats indiquent que la méthode MTP est plus fiable que la méthode CRA, et qu'elle est donc recommandée pour une utilisation en laboratoire.

Mots-clés : Production de biofilms, staphylocoques à *coagulase négative*, *S.aureus*, méthodes, alimentation de rue.

Abstract

Coagulase-negative *staphylococci* (*SCN*), commensals of human skin and nostrils, have become important pathogens thanks to their ability to form biofilms and resist antibiotics. These biofilms increase the risk of food contamination, reduce shelf life and facilitate disease transmission. In this study, 39 *SCN* samples isolated from street foods were analyzed for their ability to produce biofilms using the Congo Red Agar (CRA) and Microtiter Plate (MTP) methods. The CRA method identified 61.53% of isolates as biofilm producers, while the MTP method detected 87.18% of isolates after 24 hours of incubation, falling to 58.97% after 72 hours. *Staphylococcus aureus* strains showed a greater ability to form biofilms after 24 hours (61% strong, 33% average) compared with *SCN* (29% strong, 52% average). After 72 hours, the biofilm-forming capacity of *SCN* remained constant, while that of *S. aureus* decreased. The results indicate that the MTP method is more reliable and quantitative than the CRA method, and is therefore recommended for laboratory use. The presence of *SCN* in food requires rigorous safety measures to reduce their presence and prevent risks to consumer health.

Keywords: Biofilm production, *coagulase-negative staphylococci*, *S.aureus*, methods, street food.