



Déclaration de correction de mémoire de master 2025

Référence du mémoire N°: 123456789 / 2025

PV de soutenance N°: ..... / 2025

Nom et prénom(en majuscule) de l'étudiant (e) :	لقب و إسم الطالب(ة) :	
Lehbi Amel, Masmoudi Imene	مختارى ايمان	
La mention التقدير	Note(./20) العلامة	
.....	.....	عنوان المذكرة L'intitulé de mémoire
.....		.....
.....		
.....		

## تصريح وقرار الأستاذ المشرف: *Déclaration et décision de l'enseignant promoteur:*

<p><b>Déclaration :</b></p> <p>Je soussigné (e), ..... <u>سارة سارة</u> ..... ,          (grade) <u>م.م.ا</u> ..... à l'université          de ..... <u>جامعة بحثية</u> ..... , avoir examiné intégralement ce          mémoire après les modifications apportées par l'étudiant.</p> <p><b>J'atteste que :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* le document a été corrigé et il est conforme au modèle de la forme du département SNV</li> <li>* toutes les corrections ont été faites strictement aux recommandations du jury.</li> <li>* d'autres anomalies ont été corrigées</li> </ul>	<p><b>تصريح:</b></p> <p>أنا الممضي (ة) أسفله .....          (الرتبة) .....          بجامعة .....          ، .....          أصرح بأنني راجعت محتوى هذه المذكرة كلية مراجعة دقيقة          وهذا بعد التصحيحات التي أجرأها الطالب بعد المناقشة، وعليه          أشهد بأن :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* المذكرة تتوافق بشكلها الحالي مع النموذج المعتمد لقسم علوم              الطبيعة والحياة.</li> <li>* المذكرة صحت وفقاً لكل توصيات لجنة المناقشة</li> <li>* تم تدارك الكثير من الاختلالات المكتشفة بعد المناقشة</li> </ul>
---	---

<u>Décision :</u>	<u>قرار :</u>
Sur la base du contenu scientifique, de degré de conformité et de pourcentage des fautes linguistiques, <b>Je décide</b> que ce mémoire doit être classé sous la catégorie	اعتمادا على درجة مطابقتها للنموذج ، على نسبة الأخطاء اللغوية وعلى المحتوى العلمي أقرر أن تصنف هذه المذكورة في الدرجة :
acceptable مقبول	ordinaire عادي
E	D

## مسؤول المكتبة



جامعة القاهرة  
ادارة القسم  
قسم علوم الطبيعة والحياة  
علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والسماء

الأستاذ المشرف

## التاريخ

2025 / .... / ....

NB : Cette fiche doit être collée d'une façon permanente derrière la page de garde sur les copies de mémoire déposées au niveau de la bibliothèque universitaire



UNIVERSITÉ  
DE BISKRA

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

Référence ..... / 2025

## MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**Lekbir Amel et Maaoui Imene**  
Le :mardi 3 juin 2025

## Étude de la formation du biofilm chez les *staphylocoques* et les *entérobactéries* sous différentes conditions.

---

### Jury :

Dr.	Naouel BENHARZALLAH	MCA	Université de Biskra	Président
Dr.	Sara BOULMAIZ	MAB	Université de Biskra	Rapporteur
Dr.	Nassima BENAMEUR	MCA	Université de Biskra	Examinateur

## **Remerciement**

Avant tout, nous rendons grâce à Dieu, le Tout-Puissant, pour nous avoir accordé la volonté, la patience et la force nécessaires à l'aboutissement de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreuse, Madame BOULMAIZ Sara, pour sa confiance, son accompagnement précieux, ses conseils avisés et le temps qu'elle nous a généreusement consacré tout au long de cette recherche.

Notre reconnaissance s'étend à toute la noble équipe enseignante de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie, pour la qualité de l'enseignement reçu durant notre formation.

Enfin, nous adressons nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail, par leur aide, leur bienveillance ou leur soutien moral.

Imene & Amel ♥

## Dédicaces

Grace ALLAH ...

Je dédie ce modeste travail:

Avant tout, je rends hommage à mes chers parents, véritables piliers de ma vie, pour leur amour infini, leurs encouragements constants et les innombrables sacrifices qu'ils ont consentis afin que je puisse poursuivre mes études dans les meilleures conditions. Je vous suis éternellement reconnaissant(e). Que Dieu vous protège

A mes chères sœur:Nawel avec ses enfants Maria et Nour et Abir avec ses enfants Hala et Tadj et ma cousine Lina

A mes chères frères: Bilal, Hamza, Samir

À mes amies fidèles, pour leur précieuse compagnie, leur générosité de cœur et leur soutien dans les moments de doute comme dans les instants de réussite.

Merci à vous tous d'avoir été là, sans relâche. Cette réussite est le reflet de votre amour et de votre présence.

**A tous ceux qui m'aiment et que j'aime Imene♥**

Tout d'abord, louange à Dieu qui m'a guidé et aidé à accomplir ce travail.

J'offre ce travail à mes parents qui m'ont soutenu tout au long de cette période, par leurs prières et leur attention constante. Ils ont toujours été pour moi une source de tendresse, de force et de soutien à chaque étape. Que Dieu les protège.

À mes frères et sœurs, qui ont toujours été proches de moi par leur soutien et leurs paroles bienveillantes. Je dédie aussi ce travail à mes amis qui m'ont accompagné durant cette expérience, que ce soit par leurs mots, leur aide ou simplement par leur présence.

Et enfin, à moi-même, à celle qui a souffert, essayé et progressé pas à pas. Je te dédie ce travail comme un témoignage de l'effort fourni, du temps donné et du désir d'atteindre le but.

Amel ♥

# Tableau de matières

Liste de tableaux .....	I
Liste de figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction .....	1
<b>Chapitre 1: Généralités sur les <i>Staphylocoques</i> et les <i>Entérobactéries</i></b>	
1. Les <i>Enterobacters</i> .....	4
1.1. Historique .....	4
1.2. Définition .....	4
1.3. Taxonomie .....	4
1.4. Biotope .....	4
1.5. Caractères bactériologiques .....	5
1.5.1. Caractères morphologiques .....	5
1.5.2. Caractères culturaux .....	5
1.5.3. Caractères biochimiques .....	6
1.6. Comparaison entre les souches <i>d'entérobactéries</i> .....	6
1.7. Les dangers des <i>entérobactéries</i> dans les aliments et leur impact sur la sécurité alimentaire	8
2. <i>Staphylocoques</i> .....	9
2.1. Historique .....	9
2.2. Taxonomie .....	9
2.3. Morphologie .....	9
2.4. Habitat .....	10
2.5. Facteurs de virulence .....	10
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
2.6.1. Propriétés .....	10
2.6.2. Habitat .....	11
2.6.3. Pathogénicité et facteurs de virulence du <i>S. aureus</i> .....	11
2.7. L'effet du <i>Staphylococcus</i> sur les aliments .....	11
<b>Chapitre 2: Le biofilm</b>	
1. Introduction .....	12
2. Définition .....	12
3. Les étapes de formation d'un biofilm .....	12
3.1. Adhésion réversible .....	13

3.2. Adhésion irréversible .....	13
3.3. Formations de microcolonies .....	13
3.4. Maturations du biofilm .....	13
3.5. Dispersion du biofilm .....	14
4. Les facteurs favorisant la formation du biofilm .....	14
4.1. Les caractéristiques de la surface .....	14
4.2. Les caractéristiques du milieu .....	14
4.3. Les propriétés de cellule .....	15
5. Facteurs influençant la formation des biofilms .....	15
6. Quelle est la méthode pour étudier les biofilms bactériens en laboratoire .....	15
7. Résistance aux Antibiotiques dans les Biofilms .....	16

### **Chapitre 3 :Matériel et méthodes**

1. Cadre de l'étude .....	18
3. Approche de travail .....	18
4. Isolement .....	19
5. Conservation des souches .....	19
6. Identification .....	20
6.1. Système API 20E (bioMérieux, France) .....	20
6.1.1. Principe de la technique .....	20
6.1.2. Méthode de réalisation .....	20
7. Étude de la capacité de formation de biofilm .....	22
7.1. Teste de mucoviscosité .....	22
8. Détection de biofilm .....	23
8.1. Test qualitatif sur l'Agar Rouge Congo (CRA) .....	23
8.1.1. Élaboration du milieu Congo Agar rouge (CRA) .....	23
8.1.2. Mise en culture des isolats sur milieu Congo Red Agar .....	23
8.2. Test de formation de biofilm sur plaque à micropuits (Microtiter Plate Assay) .....	24
8.2.1. Inoculation de la microplaqué .....	24

### **Chapitre 4 :Résultats et Discussion**

1. Résultats .....	26
1.1. Isolement .....	26
1.1.1. Résultats Isolement .....	26
1.2. Identification .....	27
1.2.1. Résultats Identification par API20 E .....	27
1.3. Teste de mucoviscosité .....	29

1.3.1. Résultats de Teste de mucoviscosité.....	29
1.4. Methode qualitatif sur l'Agar Rouge Congo (CRA) .....	30
1.4.1. Résultats du test au rouge Congo .....	30
1.5. Methode Quantitative (Microtiter Plate Assay) .....	32
1.5.1.Résultatsde formation de biofilm sur plaque à micropuits (Microtiter Plate Assay).....	32
1.5.2. Lecture des résultats.....	33
1.6.Étude statistique de l'influence des conditions de culture sur la formation du biofilm par des Staphylocoques et Entérobactéries :.....	36
2.Discussion :.....	39
2.1.Isolement et Identification .....	40
2.2.Test de mucoviscosité.....	40
2.3.Test qualitatif avec l'Agar Rouge Congo (CRA) .....	41
2.4.Test de formation de biofilm en utilisant une plaque à micropuits (Essai sur plaque à micropuits) .....	43
2.5. Comparaison de la capacité des <i>Staphylocoques</i> et des <i>Entérobactéries</i> à former un biofilm sous différentes conditions d'incubation .....	45
CONCLUSION .....	46
Résumé.....	

## **Liste de tableaux**

Tableau 1.Tableau comparatif des souches d'entérobactéries.....	6
Tableau 2.Résultats du test de mucoviscosité chez certaines souches d'Entérobactéries. ....	30
Tableau 3.Résultats du test de formation de biofilm en microplaqué chez les Staphylocoques et les Entérobactéries.....	36

# Liste de figures

Figure 1. Schéma représente les différentes étapes de la formation du biofilm (Lebeaux et Ghigo , 2012) .....	13
Figure 2.Préparation du milieu de culture en conditions stériles.....	19
Figure 3.Étape d'interprétation de la galerie API 20E avec ajout des réactifs. ....	21
Figure 4.Mesure spectrophotométrique.....	23
Figure 5. Étapes de préparation avant le dépôt milieus et les échantillons dans la microplaques. ....	24
Figure 6. aspect des <i>entérobactéries</i> sur milieu EMB (Photo Personnelles ) .....	26
Figure 7.aspect des <i>entérobactéries</i> sur milieu EMB (Photo Personnelles ) . ....	27
Figure 8. aspect des <i>entérobactéries</i> sur milieu MacConkey ( Photo Personnelles ) .....	27
Figure 9. Résultat d'API20E d' <i>Enterobacter Sakazakii</i> .....	28
Figure 10.Résultat d'API20E d' <i>Citrobacter freundii</i> .....	28
Figure 11.Résultat d'API20E d' <i>Rahnella aquatilis</i> . ....	28
Figure 12. Résultat d'API20E d' <i>Enterobacter cloacae</i> .....	29
Figure 13.Résultat d'API20E d' <i>Salmonella spp.</i> .....	29
Figure 14.Colonie rouge foncé d'un <i>staphylococcus</i> (Photo Personnelles ). ....	31
Figure 15.colonie rose clair d'un <i>staphylococcus</i> (photo personnelles ). ....	31
Figure 16.colonie rose d'un <i>staphylococcus</i> (photo personnelles ). ....	32
Figure 17. microplaques après incubation .....	33
Figure 18.Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches d' <i>entérobactéries</i> (24 h, 37°C). ....	34
Figure 19.Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches de <i>staphylocoques</i> (24 h, 37°C). ....	34
Figure 20.Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches d' <i>entérobactéries</i> (3 jours, 37°C). ....	35
Figure 21.Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches de <i>staphylocoques</i> (3 jours, 37°C). ....	35
Figure 22. Production de biofilm chez les entérobactéries selon les conditions d'incubation. ....	37
Figure 23. Production de biofilm chez les staphylocoques selon les conditions d'incubation.....	39

## Liste des abréviations

### A

**ADH** :Argininedihydrolase

**API20E** : Analytical profile index 20 E (Entérobactéries )

### B

**BP** : Baird Parker

**BHI** :Infusion cerveau-cœur

### C

**CIT** :Citrate de sodium

**CLED**:Cystine lactose electrolyte deficient agar

**CRA** :Agar rouge congo

### D

**DCL**:Milieudrigalski cystine lactose

**DO** :Densité optique

### E

**E .Coli** : Escherichia coli

**EPS** : Substance polymérique extracellulaire

**EMB** :Eosin Methylene blue agar

### H

**H2S**:Hydrogénésulfuré

### G

**GEL** :Gélatine

**I**

**IU** : infection urinaire

**IND** :Production d'indole

**L**

**LDC** :Lysine décarboxylase

**LB** :Luria- Bertani

**LBGM** :Luria – bertaniglycerolmanganese

**O**

**ODC** :Ornithinedécarboxylase

**P**

**PBS** :Solution tampon phosphate buffered saline

**S**

**SCP** :Staphylococcus à coagulase positive

**SCN** : Staphylococcus à coagulase négative

**SNC** :infection du système nerveux central

**SM9** :Supplemented M9 minimal medium

**Spp** :Espèces

**SEM** :Microscopie électronique à balayage

**T**

**TDA** : Tryptophanédésaminase .

**TCP** : Methode de plaque de culture de tissus .

**TSA** :Tryptic soy agar

**TSB** :Tryptic soy broth .

**U**

**URE** :Test à l'uréase

**V**

**VP** : Test de voges-Proskauer

**V**

# **Introduction**

### Introduction

La formation de biofilms bactériens est perçue comme une stratégie microbienne naissante et dominante dans les milieux naturels et synthétiques, et elle s'établit sur toutes sortes de surfaces . Le biofilm est l'une des formes de vie les plus courantes et prospères sur notre planète . En milieu naturel, les micro-organismes se trouvent souvent protégés par des biofilms fortement hydratés, créant ainsi un environnement propice à l'adhésion des cellules, que ce soit entre elles ou sur diverses surfaces . Effectivement, les micro-organismes présents dans cette communauté génèrent une matrice similaire au ciment qui peut servir de « super-colle biologique » , facilitant l'adhérence ou le piégeage sur diverses surfaces biotiques ou abiotiques. Par exemple, les infections causées par des biofilms sur des implants ou des dispositifs médicaux internes sont ardues à éliminer du fait de leur bien plus grande protection contre les macrophages et les antibiotiques, ce qui entraîne de graves complications cliniques souvent fatales. C'est une question cruciale dans le domaine médical, car elle se développe sur les implants médicaux, au sein des tissus humains, et joue un rôle dans de nombreuses infections graves chroniques. Généralement, un biofilm désigne une communauté de micro-organismes qui s'attachent à une surface, s'intégrant et se développant dans une matrice qu'ils produisent eux-mêmes à partir de substances polymériques extracellulaires .(Abdallah et al., 2020).

Les infections dues aux biofilms constituent un enjeu de taille dans le milieu médical, des études indiquant qu'elles sont à l'origine d'environ 75 % des infections microbiennes chez l'homme, surtout lorsqu'il est question d'appareils médicaux tels que les cathéters et les implants orthopédiques.. Cela entraîne une augmentation significative des taux de mortalité et impose un fardeau économique aux systèmes de santé . Les approches conventionnelles utilisant des agents antimicrobiens peuvent ne pas être efficaces pour éliminer les infections chroniques liées aux biofilms et, dans de nombreux cas, favorisent l'émergence de résistances, ce qui est généralement observé chez les *staphylocoques*, l'un des agents les plus fréquents des infections liées aux biofilms . Actuellement, le moyen le plus efficace pour éradiquer les biofilms reste le retrait chirurgical du dispositif infecté ou le débridement de la plaie ou de l'os, mais cela peut entraîner d'autres complications. Ainsi, de nouvelles approches sonturgemment nécessaires pour prévenir et inhiber l'adhésion bactérienne et les mécanismes de formation des biofilms .(Canellas et al., 2023).

## Introduction

---

Les *entérocoques* sont des pathogènes opportunistes pouvant provoquer des infections graves et potentiellement sévères chez les individus immunodéprimés, ainsi que chez ceux recevant un traitement par antibiotiques à large spectre ou nécessitant une hospitalisation prolongée .

Les *entérocoques* attirent l'attention en raison de leur résistance multidroge, ce qui explique leur prédominance dans les infections. Ils sont naturellement résistants à un large éventail d'antibiotiques couramment utilisés, y compris les céphalosporines, les aminosides, les macrolides et le triméthoprime-sulfaméthoxazole . Les bactéries formant des biofilms sont responsables de plus de 65 % des infections nosocomiales et de 80 % des infections bactériennes, ce qui constitue une préoccupation majeure dans le domaine de l'urologie . La capacité des *Enterococcus* à produire des biofilms est l'une de leurs caractéristiques de pathogénicité les plus marquantes. Cette propriété leur permet de coloniser des surfaces inertes et biologiques, ainsi que de faciliter l'adhésion aux cellules hôtes. Il existe une variation notable du comportement des bactéries en biofilm par rapport à leurs homologues libres. Les biofilms protègent leurs membres des réponses immunitaires de l'hôte, de la phagocytose et des antibiotiques , ce qui complique la maladie. Bien qu'il soit largement admis que la thérapie antibiotique soit la méthode la plus importante et la plus efficace actuellement disponible pour la gestion des infections microbiennes, elle est parfois insuffisante à elle seule pour éradiquer le biofilm bactérien et les infections qui y sont associées.(Khalil et al., 2023).

Les *staphylocoques*, constituants normaux de la microflore cutanée et muqueuse, sont fréquemment isolés d'infections urinaires sur sondes. D'après le RAISIN (Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales en France), 65 % des infections bactériennes sont dues à la formation des biofilms qui constituent un véritable problème de santé publique (Kara Terki, 2014) .

Dans quelle mesure les conditions de culture, notamment la durée d'incubation et le renouvellement du milieu nutritif, influencent-elles la capacité des *staphylocoques* et *entérocoques* à former des biofilms résistants ?

### Hypothèses de travail

- Le temps d'incubation influence significativement la formation du biofilm bactérien.
- Le renouvellement du milieu de culture a un effet sur l'intensité et la structure du biofilm formé.

## Introduction

---

L'objectif de cette recherche est d'élargir notre compréhension du processus de création du biofilm chez les *staphylocoques* et les *entérocoques*. Ainsi, nous avons décidé de modifier certains paramètres de culture, notamment la durée de l'incubation et le rafraîchissement du milieu nutritif. Donc L'objectif est d'observer de façon plus détaillée le comportement de ces bactéries dans divers conditions , pour repérer les éléments susceptibles d'affecter leur aptitude à créer un biofilm. Une connaissance approfondie de ces processus pourrait rendre plus aisée la mise en place de stratégies de prévention et de thérapie plus performantes et personnalisées.

# Partie théorique

# Chapitre 1

## Généralités sur les

### *Staphylocoques et les*

### *Entérobactéries*

## 1. Les *Enterobacters*

### 1.1. Historique

Le genre *Enterobacter* a été proposé par Otto Rahn en 1937, marquant ainsi la fondation de la famille des *Enterobacteriaceae* pour rassembler divers microorganismes. Les *entérobactéries* présentent une grande hétérogénéité en termes de capacité pathogène. Ces espèces appartenant à cette famille sont en effet classées comme parasites, commensaux (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*) ou saprophytes (*Serratia spp*, *Enterobacter spp*) selon Bakhoum (2004).

### 1.2. Définition

La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe de nombreux genres bactériens répondant aux caractères suivants :

- Bacilles à Gram négatif.
- Immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche.
- Aérobies anaérobies facultatifs.
- Se développant aisément sur milieu ordinaire.
- Fermentant le glucose.
- Ne possédant pas d'oxydase (Avril et al ., 1992).

### 1.3. Taxonomie

Les *Enterobacteriaceae* font partie de l'ordre *Enterobacteriales*, de la classe Gamma *Proteobacteria*, du phylum *Proteobacteria* et du domaine *Bacteria*. Selon Prescott et al. (2010), l'ordre des *Enterobacteriales* ne comprend qu'une seule famille, celle des *Enterobacteriaceae*, qui se divise en 44 genres.

### 1.4. Biotope

Certaines espèces *d'entérobactéries* habitent l'environnement, tandis que d'autres se retrouvent sur les plantes et chez les animaux. Certaines souches de *Shigella*, parmi celles qui peuvent être isolées chez l'être humain, sont constamment pathogènes. Certaines espèces agissent comme des bactéries pathogènes opportunistes, provoquant des infections chez les individus affaiblis. L'identification de ceux-ci représente une tâche essentielle pour le laboratoire de bactériologie (Avril et al., 1992).

## 1.5. Caractères bactériologiques

### 1.5.1. Caractères morphologiques

Les *Enterobacteriaceae* sont:

- Des bacilles Gram négatif.
- Les dimensions sont environ 0.5 µm sur 3 µm à extrémités arrondies.
- Mobile avec ciliature péritriche par exemple *Escherichia coli*, *Proteus*, *Salmonella*, ou immobile comme chez les *Klebsiella*, *Shigella* spp, *Yersinia*.
- La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriae ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion (Minor, 1989).

### 1.5.2. Caractères culturaux

Les *entérobactéries* se développent rapidement in vitro sur des milieux ordinaires.

- La température optimale de croissance est 37°C, mais la culture est possible entre 20 °C et 40 °C .
- Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes.
- Pour la plupart des espèces, les colonies formées après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C sont bombées, rondes et régulières ; leur surface est lisse et brillante : il s'agit des formes S (« Smooth »)
- Sur gélose, les colonies atteignent 2 millimètres de large, sauf celles des *Yersinia*, qui sont plus petites.
- En milieu liquide, les *entérobactéries* occasionnent un trouble uniforme du bouillon (Joly et Reynaud, 2002).
- Elles se développent en aéro-anaérobiose sur des milieux classiques d'isolement, tels que BCP, CLED, Drigalski lactose, et bleu de bromothymol, ainsi que sur des milieux sélectifs comme DCL, Hektoen et MacConkey.
- Les Protéus ont tendance à envahir la gélose et y former un tapis uniforme.
- Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges, grasses et luisantes.
- La plupart se multiplient en milieux synthétiques avec une source de carbone simple comme le glucose (Grosjean et al., 2016).

### 1.5. 3. Caractères biochimiques

Les bactéries entériques sont tellement semblables en morphologie, on utilise des tests biochimiques pour les identifier :

- Elles sont dépourvues de cytochrome oxydase.
- La production d'indole à partir du tryptophane.
- Possèdent une nitrate réductase, enzyme qui réduit les nitrates en nitrites
- Dégradent le glucose par une voie fermentaire avec ou sans production de gaz.(Wang et al.,2008).
- Les bactéries entériques qui produisent de grandes quantités de gaz au cours de fermentation des sucres, sont la majorité oxydase négatif, catalase positif, nitrate positif. (Grosjean et al.,2016).

### 1.6. Comparaison entre les souches *d'entérobactéries*

**Tableau 1. Tableau comparatif des souches *d'entérobactéries*.**

Type	Définition	Habitat	Caractères bactériologiques/biochimiques	Pouvoir pathogène
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> est un bacille de type Gram négatif qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae. Espèce bactérienne mais aéro-anaérobie facultative commensale la plus courante dans le microbiome intestinal, agent pathogène important chez l'homme. Impliquée dans gastro-entérite, toxi-infection alimentaire, infections urinaires, syndromes hémolytiques,	Présente normalement dans le système digestif des humains et animaux, espèce aérobie prédominante dans le tube digestif (10 <sup>9</sup> /g de matières fécales). Présence dans l'eau indique contamination fécale récente (Avril et al., 1992).	- Génération d'indole à partir du tryptophane - Mobilité par ciliature péritricale - Fermentation du lactose - Test de voges-proskauer négatif, dépourvu d'urease - Division toutes les 20 minutes sous conditions optimales - Colonies de 1 à 4 mm, arrondies, lisses, brillantes - Souches capsulées ont apparence muqueuse (Avril et al., 1992).	Relation mutualiste commensale, mais peut être pathogène opportuniste ou obligatoire via facteurs de virulence spécifiques. Symptômes cliniques diversifiés (Pantel, 2015).

	bactériémies et méningites néonatales (Basmaci et Cohen, 2018).			
<i>Citrobacter freundii</i>	Bacilles ou coccobacilles mobiles, genre <i>Citrobacter</i> , facultativement anaérobiques, dimensions 0,3-1 $\mu\text{m}$ diamètre, 0,6-6 $\mu\text{m}$ longueur (Abbott, 2007).		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fermentation du mannitol</li> <li>- Production de H<sub>2</sub>S gazeux</li> <li>- Utilisation du citrate de sodium comme source de carbone unique (Chen et al., 2002 ; Knirel et al., 2002).</li> </ul>	Agents infectieux opportunistes rares nosocomiaux provoquant infections urinaires, bactériémies, sepsis abdominaux, abcès cérébraux, pneumonies, infections néonatales (méningite, sepsis, infection articulaire, bactériémie) (Pepperell et al., 2002 ; Ryan, 2004). Infections SNC plus fréquentes chez bébés <2 mois (Ryan, 2004).
<i>Enterobacter</i>		Fréquent dans sol et eau, colonise intestins humains et bêtes, présent dans eaux résiduaires. Associé à hospitalisme (Hart, 2006 ; Avril et al., 1992).	<p>Espèce type : <i>Enterobacter cloacae</i> (Avril et al., 1992).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Production d'acide par fermentation glucose</li> <li>- Test rouge de méthyle négatif</li> <li>- Test VP positif (Hart, 2006).</li> </ul>	Agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales : bactériémie, infections respiratoires et urinaires, endocardite, infections intra-abdominales et ophtalmiques, arthrite septique,

				ostéomyélites (Fraser et al., 2010).
--	--	--	--	--

## 1.7. Les dangers des *entérobactéries* dans les aliments et leur impact sur la sécurité alimentaire

Les membres de la famille des Enterobacteriaceae sont très répandus. Même si certaines variétés d'espèces sont des commensaux sans danger, d'autres constituent de sérieux agents infectieux pour les êtres humains et les animaux. L'importance de ces derniers est accrue, étant donné que l'habitat naturel de plusieurs membres de la famille des Enterobacteriaceae se trouve dans le tube digestif des animaux. Les *Enterobacteriaceae* ont donc été employées depuis de nombreuses années comme organismes témoins dans le secteur de l'alimentation. , lors de l'évaluation de la qualité microbiologique, le compte d'Enterobacteriaceae ainsi que la détection de coliformes *E. coli* sont des indicateurs pertinents pour déterminer une détérioration de l'hygiène et une éventuelle anomalie dans le processus de production.

Cette famille englobe plusieurs agents infectieux alimentaires majeurs, comme les *Salmonella spp.* Ou *Shigella spp.* productrices de toxines. Par ailleurs, même si la plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives et commensales, certains sérotypes d'*E. coli* produisent des toxines et sont jugés pathogènes. Pour ce qui est des denrées alimentaires, l'agent pathogène le plus notable est *E. coli*O157:H7, devenu l'un des agents infectieux d'origine alimentaire les plus prépondérants. L'antibiorésistance des *Enterobacteriaceae* face à plusieurs antibiotiques représente un enjeu crucial de la médecine contemporaine.

En se basant sur les informations précédentes, le but de cette étude est de passer en revue la littérature concernant l'importance des *Enterobacteriaceae* pour la sécurité alimentaire, en lien avec deux catégories d'aliments essentiels : les fromages traditionnels élaborés à partir de lait non pasteurisé et les produits carnés traditionnels.

L'insuffisance d'hygiène personnelle parmi les travailleurs en contact avec la nourriture dans le secteur du commerce de détail est souvent mentionnée comme un facteur contribuant aux maladies alimentaires. Même avec une sensibilisation grandissante aux pratiques sûres de manipulation des aliments et la formation en matière d'hygiène alimentaire dispensée aux manipulateurs, une étude menée par Lues et Van Tonder (2007) a révélé la présence d'*Enterobacteriaceae* sur 44 % des mains des manipulateurs d'aliments et sur 16 % des tabliers. les espèces de *Klebsiella spp.* ont été identifiées comme étant les plus fréquentes sur

les écouvillons prélevés chez les bouchers, avec une fréquence décroissante pour les genres *Citrobacter*, *Raoultella* et *Escherichia coli*. (Lebeaux & Ghigo, 2012).

## 2. *Staphylocoques*

### 2.1. Historique

Les premières identifications des *staphylocoques* (bactéries en forme de coques) extraits du pus d'abcès remontent à 1871. Cependant, ce n'est que quelques années plus tard que ces recherches ont conduit à la proposition d'un nom pour cette bactérie. C'est en 1878 que Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en France, en 1880, ont décrit des amas de coques dans du pus d'origine humaine. Cette année-là, en Écosse, Alexander Ogston suggère le terme « *Staphylococcus* » (staphylê : grappe et kokkos : grain) car les bactéries tendent à se rassembler en masses inégales qui rappellent une grappe de raisin. *Staphylococcus* est ainsi distingué de *Streptococcus*. Finalement, en 1884, Anton Julius Friedrich Rosenbach, en Allemagne, décrit pour la première fois le genre *Staphylococcus* après avoir cultivé les bactéries sur un milieu solide. Il distingue donc *S. aureus* de *S. albus* en se basant sur la coloration des pigments générés par les colonies. (Hennekinne, 2009).

### 2.2. Taxonomie

Le genre *Staphylococcus* se classe dans : le phylum des *Firmicutes* (bactéries Gram-positives), la classe *Bacilli* et l'ordre *Bacillales*. En plus des *Staphylococcus sp.*, la famille bactérienne des *Staphylococcaceae* englobe quatre autres genres moins familiers : *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*. (Hennekinne, 2009).

### 2.3. morphologie

Le genre *Staphylococcus* se caractérise par des cellules sphériques non mobiles ayant un diamètre variant de 0,5 à 2,5 µm, souvent disposées en duo ou en groupes. Ces coques à Gram positif partagent des traits physiologiques communs ; elles sont chimio-organotrophes, aérobies ou anaérobies facultatives et possèdent une catalase. Jusqu'à présent, on a identifié cinquante espèces et sous-espèces qui appartiennent au genre *Staphylococcus*. Les espèces sont souvent catégorisées en deux catégories selon leur aptitude à générer une coagulase libre : les *staphylocoques* à coagulase positive (SCP), fréquemment perçus comme les plus pathogènes, et les *staphylocoques* à coagulase négative (SCN). (Hennekinne, 2009).

## 2.4. Habitat

Les *staphylocoques* sont des bactéries ubiquistes (Hennekinne, 2009). L'homme et les animaux à sang chaud constituent le réservoir naturel des *staphylocoques*. Son habitat écologique principal se situe dans la partie avant du nez. La proportion de portage nasal chez les individus en bonne santé fluctue entre 20% et 55%, en fonction de la population examinée. On peut identifier trois catégories de portage nasal : environ 20% des individus sains sont des porteurs constants, 60% sont des porteurs occasionnels et 20% ne le sont pas du tout. Il est possible que ces profils évoluent avec le temps (Touaitia, 2016).

## 2.5. Facteurs de virulence

On a dénombré un grand nombre de facteurs de virulence chez les *staphylocoques*. Ils sont codés par des gènes situés sur le chromosome ou sur les éléments génétiques mobiles. Ces facteurs sont responsables de la codification des protéines de surface ou des exoprotéines et cela permet à la bactérie de défendre contre le système immunitaire, de s'attacher aux cellules, de se propager dans l'organisme, mais également d'exploiter les nutriments et l'énergie disponibles. (Kara Terki, 2014).

Les *staphylocoques* possèdent également des capacités d'adhérence aux matériaux inertes (corps étrangers, prothèses) et de formation d'un biofilm, qui constitue le facteur de virulence majeur de ces bactéries (Kara Terki, 2014).

## 2.6. *Staphylococcus aureus*

### 2.6.1. Propriétés

*Staphylococcus aureus* est un microbe qui fait partie de la catégorie des cocci gram-positifs et qui se développe en grappes. Cette bactérie, qui ne produit pas de spores mais qui est résistante, peut persister sur des objets inanimés et secs pendant une longue durée (Rebiahi, 2012).

*S. aureus* est une bactérie facultativement aéroanaérobiose et thermosensible, qui nécessite des températures de croissance situées entre 6 et 46°C (avec une préférence à 37°C). C'est une bactérie neutrophile qui se développe entre un pH de 4 et 9,8 (Hennekinne, 2009). Les variétés de *S. aureus* se caractérisent par : indole -, acétone +, uréase +, réduisent le tellurite de potassium et les nitrates en nitrites, et génèrent de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Touaitia, 2016).

## 2.6.2.habitat

*S. aureus* est un microbe commensal qui réside sur la peau et les muqueuses, cependant son habitat écologique principal se situe dans la zone frontale du nez. Le *staphylocoque* doré (également appelé *S. aureus*) est présent chez 15 à 30 % des individus en bonne santé dans les fosses nasales et la gorge, il peut également être trouvé (en petite quantité) dans le système digestif et la zone périnéale (Ghernaout-Benchouk, 2013).

## 2.6.3.Pathogénicité et facteurs de virulence du *S. aureus*

Les infections par le *staphylocoque* se manifestent fréquemment par des infections suppuratives superficielles cutanéo-muqueuses qui peuvent se compliquer par la propagation du point d'infection initial. Il peut parfois s'agir d'infections non suppuratives dues à un phénomène de toxicité. (David, 2010).

La fréquence et la sévérité des infections à *S. aureus* peuvent être attribuées à divers éléments, notamment la présence omniprésente de la bactérie et la multi-résistance de certaines souches aux antibiotiques. Ces éléments sont considérés comme des facteurs de virulence. En effet, le *staphylocoque* possède des propriétés lui permettant de secréter des facteurs d'adhésion, des enzymes de résistance et même des toxines (David, 2010).

## 2.7. L'effet du *Staphylococcus* sur les aliments

On associe fréquemment les *Staphylococcus spp.* aux cas d'intoxication alimentaire et aux épidémies à l'échelle mondiale, en raison de la capacité de certaines souches à produire diverses sortes d'entérotoxines. Les aliments d'origine animale, comme le lait et le fromage, sont naturellement sujets à la contamination par ces micro-organismes. Ces derniers peuvent ensuite se multiplier et générer des entérotoxines. Ces substances sont résistantes à la chaleur et conservent leur stabilité même après les traitements thermiques généralement utilisés dans l'industrie alimentaire. Elles constituent un danger pour les consommateurs, d'où la nécessité de contrôler ces micro-organismes lors des premières étapes de production (Viçosa et al., 2010).

# **Chapitre 2**

## **Le biofilm**

## 1. Introduction

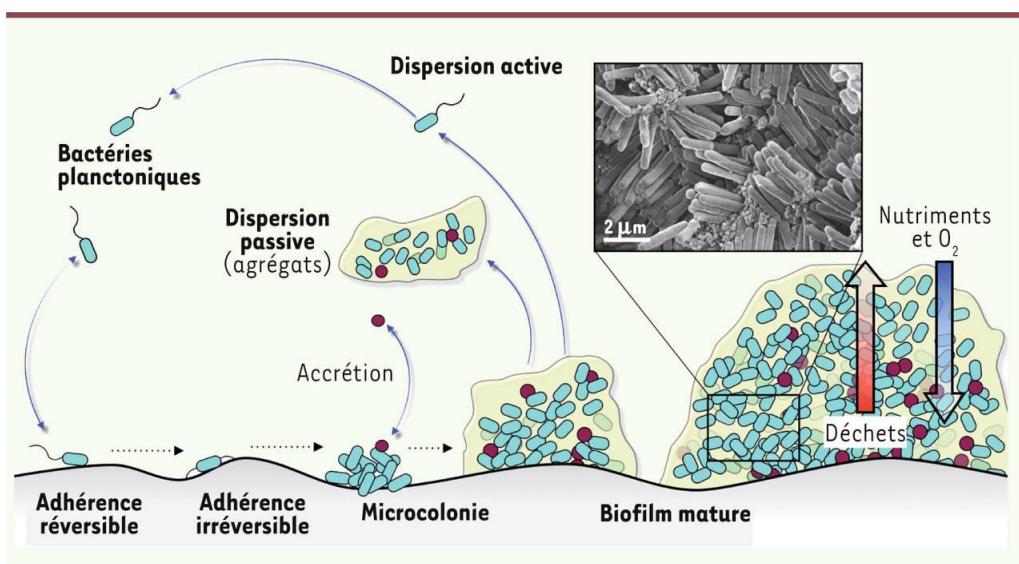
L'hypothèse selon laquelle les bactéries se développent de manière préférentielle sur des surfaces a été proposée de manière récurrente au cours des 150 dernières années (Costerton, 1999). De même, certains microbiologistes ont observé par microscopie optique que les bactéries planctoniques se comportaient différemment après s'être fixées à une surface et avoir déclenché la formation d'un biofilm. Les expressions « bactéries sessiles » et « bactéries planctoniques » se réfèrent à des micro-organismes qui adhèrent à une surface ou qui sont libres dans une suspension, respectivement. La surface d'attachement des organismes sessiles peut être abiotique (les matériaux inertes) ou biotique (les tissus ou cellules vivantes) (Dunne, 2002).

## 2. Définition

On définit le biofilm comme une communauté microbienne ou un groupement plurimicrobien enveloppé dans une matrice polymérique qu'il a lui-même produite et qui peut renfermer des éléments de l'hôte. Cette matrice peut constituer jusqu'à 85% du volume total du biofilm. Cette modalité de vie dynamique et vivante constitue 99% de leur existence naturelle, en contraste avec la forme planctonique qui représente le reste [(Filloux et al., 2003) ; (Phillips et al., 2011)]. Selon Monsel et al. (2018), les biofilms présents sur les sondes endotrachéales peuvent servir de réservoir bactérien susceptible d'infecter le tissu pulmonaire (Figure 01).

## 3. Les étapes de formation d'un biofilm

La formation se déroule en plusieurs étapes (Tremblay et al., 2014) (Figure 01) :



**Figure 1.** Schéma représente les différentes étapes de la formation du biofilm (Lebeaux et Ghigo , 2012)

### 3.1. Adhésion réversible

Au cours de cette phase, l'interaction initiale peut être passagère et réversible en raison d'interactions limitées entre la bactérie et la surface, une étape que l'on nomme adhésion (Khattoon et al., 2018). Selon Lebeaux et al. (2016), les propriétés physicochimiques d'une bactérie, comme son hydrophobie et sa charge électrostatique, déterminent sa capacité à s'adhérer initialement à une surface.

### 3.2. Adhésion irréversible

Grâce à la production d'exopolymères par les bactéries, l'adhésion se transforme en un processus irréversible qui renforce leur attachement au support. Dans cette situation, des interactions intenses se créent entre la bactérie et la surface grâce à des liaisons de type hydrophobe. La production de EPS, qui commence dès les premières phases d'adhésion, continue pendant la maturation du biofilm (Van Houdt et Michiels, 2005).

### 3.3. Formations de microcolonies

L'ensemencement de microcolonies se fera sur l'ensemble du support ou partiellement, en fonction des caractéristiques de surface des bactéries et des matériaux [(Costerton et al., 1999); (Roux et al., 2006)].

### 3.4. Maturations du biofilm

Les bactéries produisent un exopolysaccharide ainsi que d'autres éléments de la matrice polymère (Tremblay et al., 2014). Le biofilm connaît une expansion massive qui provoque une hausse significative de son épaisseur, formant ainsi un film hétérogène en trois dimensions

(Sauer et al., 2002).

Cette configuration tridimensionnelle crée des canaux qui facilitent le passage des nutriments et de l'oxygène, tout en permettant la libération des produits issus du métabolisme bactérien (Costerton et al., 1999).

### **3.5. Dispersion du biofilm**

C'est une phase cruciale du cycle de vie des biofilms qui favorise la multiplication biologique, la pérennité bactérienne et la propagation de la maladie (Kaplan, 2010). Le développement de la composition de la biomembrane est crucial, car c'est le processus qui permet aux bactéries de se multiplier d'une région du corps à une autre, favorisant ainsi l'expansion de l'infection [(Kaplan, 2010); (Khatoon et al., 2018)].

La dispersion passive désigne tout simplement un phénomène de décollement physique causé par des forces extérieures comme le cisaillement des liquides et des matières solides, ou encore par des actions mécaniques (comme se brosser les dents). Par exemple, un filament de biofilm peut être détaché de la masse centrale par le courant du fluide interstitiel, ou un biofilm situé dans une blessure peut être physiquement retiré par un opérateur (Fleming &Rumbaugh, 2017).

## **4. Les facteurs favorisant la formation du biofilm**

Le processus de formation d'un biofilm est une réalité complexe, influencée par plusieurs éléments : les propriétés du substrat sur lequel les bactéries s'installent, les forces appliquées dans l'environnement, les caractéristiques de ce dernier et les attributs des surfaces cellulaires (Donlan, 2002).

### **4.1. Les caractéristiques de la surface**

Tout matériau en contact avec un liquide contenant des bactéries peut potentiellement servir de substrat pour la création d'un biofilm. La rugosité, les caractéristiques chimiques d'une surface et l'existence de films protéiques préexistants affectent l'adhérence des bactéries sur cette surface et la création d'un biofilm (De Chalvet et De Rochemonteix, 2009).

### **4.2. Les caractéristiques du milieu**

Des facteurs tels que la température, le pH, les caractéristiques hydrodynamiques du fluide, la concentration en certains cations, la concentration en nutriments, la source de carbone, la concentration en oxygène et fer, ainsi que l'osmolarité, jouent un rôle crucial dans l'adhésion des bactéries (Mahami et Adu-Gyamfi, 2011).

#### 4.3. Les propriétés de cellule

Le caractère hydrophobe de la surface cellulaire, la présence de fimbriae et de flagelles, ainsi que la production d'exopolysaccharides ont un impact sur l'adhérence des bactéries à une surface. L'adhérence des micro-organismes à une surface est influencée par son caractère hydrophobe. Plus les matériaux sont non polaires, plus l'importance des liaisons hydrophobes s'accroît. (Donlan, 2002).

### 5. Facteurs influençant la formation des biofilms

La composition des biofilms est influencée par des éléments environnementaux, comme la température, le pH et la disponibilité en nutriments. Même si leur composition peut fluctuer, les éléments majeurs sont habituellement l'eau, les cellules bactériennes et leurs EPS qu'elles sécrètent. Les biofilms sont des configurations complexes fortement hydratées, car ils intègrent d'importantes quantités d'eau par le biais de liaisons hydrogène. Ainsi, dans la matrice du biofilm, l'eau constitue le composant dominant, représentant jusqu'à 97 % de sa masse. Un biofilm est perçu comme une structure poreuse et absorbante comportant des canaux d'eau et des pores. Les canaux aquatiques assurent la répartition des nutriments, de l'oxygène et même de micro-organismes grâce à la dynamique des fluides. Les polymères extracellulaires forment environ 1 à 2 % du poids de la matrice du biofilm, tandis que les cellules microbiennes constituent approximativement 2 à 5 % de cette même matrice (Alotaibi & Bukhari, 2021).

### 6. Quelle est la méthode pour étudier les biofilms bactériens en laboratoire

Les méthodes expérimentales traditionnelles pour examiner les microorganismes ne conviennent pas à l'étude de leur mode de vie complexe dans les biofilms. Ainsi, au fil des dernières années, les chercheurs ont élaboré divers modèles expérimentaux alliant analyse moléculaire et microscopie. Les bactéries modèles : La plupart des espèces bactériennes analysées en laboratoire créent des biofilms. Les bactéries modèles qui ont fait l'objet de nombreuses études sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*.

On peut facilement manipuler ces bactéries Gram négatives, qu'elles soient pathogènes ou commensales, ce qui a permis d'identifier et d'étudier de nombreux éléments moléculaires impliqués dans la formation des biofilms. Plusieurs équipes collaborent aussi avec la bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus*, impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales

\* Les modèles de culture : Analyse des biofilms à l'aide de microplaques : Le recours aux modèles statiques de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* a largement contribué à éclaircir ce mode de vie. L'approche utilisant des microplaques multi-puits, combinée avec l'étude de mutants de transposition, a conduit à la découverte d'un grand nombre de gènes participant à la création de biofilms sur des surfaces abiotiques (Genevaux, Muller et Bauda, 1996 ; Pratt et Kolter, 1998 ; O'toole et Kolter, 1998). De nombreux laboratoires exploitent ce modèle pour examiner les phases initiales de la formation des biofilms.

Examen des biofilms matures : Pour déterminer et analyser les éléments moléculaires participant à la maturation et à l'organisation du biofilm, on fait appel à des systèmes de culture continue tels que le micro-fermenteur ou les cellules en flux (flow-cell), colonisés par des souches bactériennes produisant des protéines fluorescentes (Beloin, DA RE et Ghigo 2005). L'élaboration de la structure tridimensionnelle du biofilm est par la suite observée à l'aide de la microscopie confocale laser (Reisner et al, 2003).

## 7. Résistance aux Antibiotiques dans les Biofilms

L'apparition et la diffusion de la résistance aux antimicrobiens au sein des bactéries représentent l'un des enjeux de santé majeurs à l'échelle internationale. Une des conséquences des communautés de biofilm bactérien qui favorisent les infections chroniques est la résistance aux antibiotiques (Abebe, 2020).

Ceci est attribué à la formation de biofilms et l'encapsulation subséquente des bactéries dans une matrice complexe qui peut renforcer leur résistance aux agents antimicrobiens et de stérilisation, rendant ainsi leur élimination et leur régulation difficiles. La matrice des substances polymériques extracellulaires (EPS) offre une protection aux bactéries contre les antibiotiques, entravant l'infiltration des médicaments à des niveaux bactéricides. Les bactéries présentes dans un biofilm présentent une résistance plusieurs fois supérieure aux antibiotiques comparativement aux bactéries planctoniques. Par exemple, les biofilms peuvent résister à des agents antimicrobiens à des concentrations de 10 à 1000 fois supérieures à celles nécessaires pour neutraliser des bactéries planctoniques de même origine génétique.

La résistance des micro-organismes dans un biofilm peut être attribuée aux facteurs suivants :

(a) la matrice polymérique qui peut limiter la diffusion des antibiotiques,

(b) l'interaction entre les antibiotiques et la matrice polymérique qui diminue leur efficacité,

- (c) la résistance induite par des enzymes telles que la  $\beta$ -lactamase,
- (d) les modifications de l'activité métabolique au sein du biofilm,
- (e) les altérations génétiques au niveau des cellules cibles ou le camouflage de ces sites,
- (f) l'expulsion des antibiotiques via les pompes d'efflux,
- (g) la présence d'une structure de membrane externe, comme observé chez les bactéries à Gram négatif.

Ces processus sont essentiels pour la résistance bactérienne aux antibiotiques et leur persistance au sein du biofilm. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques employés par les bactéries dans le biofilm sont distincts et différents des mécanismes de résistance naturels ou innés. Les bactéries présentes dans le biofilm mettent en place diverses tactiques moléculaires pour défendre leurs cellules face à des conditions adverses, notamment l'interaction de la matrice du biofilm avec les antibiotiques qui peut entraver ou réduire leur efficacité, une croissance lente où les antibiotiques perdent de leur efficacité, une résistance génétiquement associée, et la génération de cellules persistantes capables de tolérer divers antibiotiques.

Le biofilm est un acteur majeur dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques. Dans une population bactérienne dense, un transfert horizontal efficace des gènes de résistance et de virulence se produit. La densité élevée de micro-organismes au sein de la matrice crée un contact entre eux, favorisant ainsi l'échange de gènes de résistance. En fin de compte, toute la communauté peut s'approprier ce gène de résistance (Abebe, 2020).

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre 3**

## **Matériel et Méthodes**

## 1. Cadre de l'étude

Cette recherche a été réalisée au sein du laboratoire de la Faculté des Sciences Naturelles et de la Vie El Hadjeb, rattachée à l'Université de Biskra, entre le 2 février et le 17 avril 2025.

## 2. Objectifs du travail

Notre recherche vise à mesurer en milieu contrôlé la capacité de différentes souches de *Staphylococcus* et *d'entérobactéries* à former des biofilms, tout en considérant la durée d'incubation et le renouvellement régulier du même genre de milieu de culture.

## 3. Approche de travail

L'étude a examiné un ensemble de 48 souches bactériennes, réparties comme suit : 39 types de *Staphylococcus* et 9 types *d'Entérobactéries*.

Ces souches ont été isolées et employées pour l'évaluation de la formation du biofilm. Elles ont été élevées sur trois sortes de milieux de culture, en fonction des caractéristiques de chaque souche :

### 1- Agar MacConkey

But : Milieu sélectif et différentiel ; identification des entérobactéries(Enterobacteriaceae)(Burke, n.d.).

Milieu : Contient des sels biliaires pour inhiber la plupart des bactéries Gram positives, sauf *Enterococcus* et certaines espèces de *Staphylococcus*, ainsi que du peptone et du Lactose(Burke, n.d.).

Réactifs/Indicateurs : Contient du violet de cristal et des sels biliaires, qui inhibent les bactéries Gram positives, et du rouge neutre, un colorant qui teinte en rose les microbes capables de fermenter le lactose (ce qui diminue le pH)(Burke, n.d.).

### 2- Agar EMB

But : Milieu sélectif et différentiel ; identification des *entérobactéries* (Enterobacteriaceae).

Utilisé principalement pour distinguer les coliformes des non-coliformes lors des analyses de l'eau(Burke, n.d.).

Milieu : Éosine, bleu de méthylène, lactose, saccharose(Burke, n.d.).

Réactifs/Indicateurs : Éosine Y et bleu de méthylène(Burke, n.d.).

### Agar Baird-Parker (BP)

L'agar BP a soutenu la croissance de toutes les espèces de *Staphylococcus* après 48 h d'incubation, à l'exception de *S. haemolyticus* M/0021(Aryal, 2022).

### 4. Isolement

Le choix des milieux de culture a été fait en fonction de la bactérie à analyser. Concernant les *Entérobactéries*, l'utilisation a été faite des milieux MacConkey et EMB, tandis que le milieu Baird-Parker a servi à l'isolement des *Staphylocoques*. Le semis a été effectué en lignes étroites sur la surface des milieux pour obtenir des colonies séparées, puis les boîtes ont été placées en incubation à 37°C pendant une durée de 24 heures. Pour garantir la pureté des souches, plusieurs inoculations successives ont été réalisées. Il a fallu jusqu'à cinq repiquages pour obtenir des colonies pures (souches pures) à partir de certaines souches d'*Entérobactéries*, alors que la pureté des souches de *Staphylocoques* a été atteinte dès le troisième repiquage. Ces étapes étaient cruciales pour assurer l'exactitude de la phase d'identification qui suit.



**Figure 2.**Préparation du milieu de culture en conditions stériles.  
Source : Auteur, 2025

### 5. Conservation des souches

L'isolement purifié a été conservé à court terme en le transférant sur une gélose nutritive inclinée à l'aide d'une anse de platine. Suite à une incubation à 37°C pendant un jour, les tubes ont été stockés dans un réfrigérateur à basse température de 4°C (Touaitia, 2016).

La conservation à long terme des souches a été effectuée par piqûre centrale dans la gélose de conservation en tube. Après une incubation de 24 heures à une température de 37°C. Les tubes ont été conservés à une température ambiante (Touaitia, 2016).

## 6. Identification

l'identification a été réalisée par la galerie miniaturisée API 20 E (Bio-Mérieux, France)

### 6.1. Système API 20E (bioMérieux, France)

#### 6.1.1. Principe de la technique

Le système API 20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux API 20E manual. 2010).

#### 6.1.2. Méthode de réalisation

##### 6.1.2.1 Préparation de l'inoculum

On a prélevé cinq échantillons des souches bactériennes stockées en utilisant des anse de platine. Ils ont été introduits dans des boîtes remplis de milieu de Chapman, puis les cultures ont été incubées pendant une journée à 37°C.

Après l'incubation, utilisez un tube rempli d'eau physiologique stérile. En utilisant une anse de platine, recueillez une unique colonie bien distinguée sur un milieu Chapman. Effectuer une suspension bactérienne en homogénéisant minutieusement les bactéries dans le milieu.

Employer cette suspension de manière temporaire.

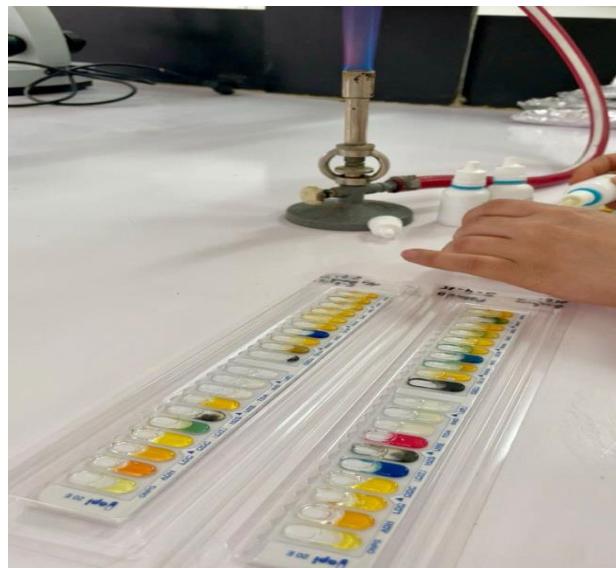
##### 6.1.2.2. Inoculation de la galerie (Khennouchi, 2016)

- Introduire la suspension bactérienne dans les microtubes de la galerie à l'aide de la même pipette :

Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule.

Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules).

- Pour les tests ADH, LDC, ODC, H2S, URE, créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte et incuber à 37°C pendant 18-24 heures.
- Après 24 heures : Ajouter 1 goutte de réactif TDA dans la cupule du test TDA. Ajouter 1 goutte de réactif JAMES sur le test IND. Ajouter 1 goutte des réactifs VP1 et VP2 sur le test VP, attendre au minimum 10 minutes.



**Figure 3.** Étape d'interprétation de la galerie API 20E avec ajout des réactifs.

Source : Auteur, 2025

#### 6.1.2.3. Lecture et interprétation des résultats

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture. L'interprétation est réalisée à l'aide d'une feuille de calcul en format Excel (Khennouchi, 2016).

**Tableau 02 :** Tableau de lecture de l'API 20 E (BioMérieux API 20E manual. 2010).

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats Négatif	Résultats Positif
<b>ONP G</b>	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
<b>CIT</b>	Citrate de	Utilisation du citrate	Vert	Bleu-vert/vert

	sodium			
<b>H2S</b>	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/gris	Dépôt noir / fin
<b>URE</b>	Urée	Uréase		Rouge/orange
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophanédésaminase	Jaune	TDA / Immédiat Marronfoncé
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	Jaune	IND / 2 min, <b>maxi</b> Anneau rouge
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	incolore	VP 1 + VP 2 / 10 min Rosé-Rouge
<b>GEL</b>	Gélatine de Kohn	Gélatinase	incolore	Rosé-rouge / Diffusion du pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>SAC</b>	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>MEL</b>	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu	Jaune

## 7. Étude de la capacité de formation de biofilm

### 7.1. Teste de mucoviscosité

Ce test sert à mesurer la capacité des souches bactériennes à adhérer et à former un biofilm.

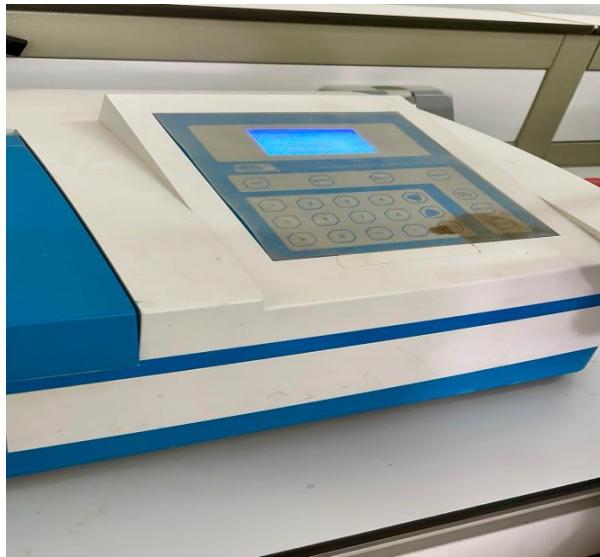
Pour examiner le phénotype hypermucoviscque typique des souches de la famille des *Entérobactéries*, nous les avons cultivées dans un bouillon LB pendant une durée de 24 heures à une température de 37°C.

Par la suite, un 1mL de chaque culture a été transféré dans des tubes de microcentrifugation d'un volume de 1,5 mL. On a mesuré la densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>) avant et après une centrifugation de 5 minutes à 1000 × g.

Le calcul de la mucoviscosité a été effectué en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de mucoviscosité} = \frac{(DO_{\text{après centrifugation}})}{(DO_{\text{avant centrifugation}})} \times 100. \text{ (Beckman et al., 2024)}$$

Les valeurs obtenues ont été représentées sous forme de moyenne du pourcentage de mucoviscosité, avec l'erreur exprimée en  $\pm$  écart-type de la moyenne (SEM). (Beckman et al., 2024).



**Figure 4.** Mesure spectrophotométrique.

Source : Auteur, 2025

## 8. Détection de biofilm

### 8.1. Test qualitatif sur l'Agar Rouge Congo (CRA)

Nous avons utilisé l'environnement Agar Congo Red (CRA) pour détecter les bactéries qui produisent des biofilms. Ces bactéries génèrent des colonies noires qui semblent cristallines, tandis que celles qui n'ont pas la capacité de produire un biofilm forment des colonies d'une couleur rose rougeâtre (Sharma et al., 2023).

#### 8.1.1. Élaboration du milieu Congo Agar rouge (CRA)

On a préparé le milieu CRA (Agar Congo Rouge) en mélangeant 37 g de saccharose, 5 g de NaCl, 15 g d'agar, 0,8 g de rouge Congo et 10 g de BHI (BrainHeart Infusion). Nous avons dissous les ingrédients dans un litre d'eau distillée. Le mélange a été chauffé jusqu'à ébullition jusqu'à ce que tous les éléments soient complètement dissous, puis transféré dans l'autoclave pour la stérilisation.

#### 8.1.2. Mise en culture des isolats sur milieu Congo Red Agar

- Le milieu préparé a ensuite été versé dans des boîtes de Pétri, laissé à refroidir et à se solidifier. Les isolats purs ont été ensemencés par stries et incubés à 37 °C pendant 24 heures.

## 8.2. Test de formation de biofilm sur plaque à micropuits (Microtiter Plate Assay)

L'une des techniques les plus courantes et normalisées pour identifier la formation de biofilms est le test sur plaque de culture tissulaire (TCP). (Christensen et al., 1985, mentionné dans Mathur et al., 2006).

### 8.2.1. Inoculation de la microplaqué

Nous avons cultivé quarante-huit (48) souches bactériennes, dont trente-neuf (39) appartenant au genre *Staphylococcus* et neuf (9) au genre des *Entérobactéries*, sur un milieu solide TSA., puis nous les avons incubées pendant 24 heures à une température de 37 °C. Suite à une incubation, en utilisant d'une anse en platine, une colonie distincte de chaque souche a été prélevée pour créer une suspension bactérienne dans un tube contenant une solution physiologique (eau saline).

En utilisant une micropipette, 200 microlitres du milieu TSB ont été répartis dans chaque puits des microplaques. Par la suite, trois puits réservés à chaque souche ont reçu chacun 20 microlitres de la suspension bactérienne. Les trois derniers puits de chaque plaque n'ont pas reçu d'inoculation bactérienne et ont servi de témoins négatifs.

Du fait du nombre total de souches utilisées, il a été nécessaire d'utiliser deux microplaques (microplaques à 96 puits) pour disposer tous les échantillons.



**Figure 5.** Étapes de préparation avant le dépôt milieus et les échantillons dans la microplaqué.  
Source : Auteur, 2025

Les microplaques ont par la suite été incubées à une température de 37 °C. Pour analyser l'impact du temps sur la formation du biofilm.

L'impact de la durée sur la formation du biofilm a été étudié en incubant une première microplaqué pendant 24 heures, et une seconde pendant trois jours à une température de 37 °C.

Pour examiner l'impact du renouvellement du milieu sur la création du biofilm La troisième microplaqué a subi une incubation de 72 heures, avec un rafraîchissement du milieu TSB toutes les 24 heures. Quotidiennement, le milieu usé a été éliminé et substitué par une nouvelle portion identique de ce même milieu (200 microlitres), dans le but d'examiner l'impact du remaniement du milieu sur la développement du biofilm.

Suite à la phase d'incubation, les puits ont été minutieusement aspirés et rincés trois fois avec 200 microlitres de solution PBS stérile dans le but d'éliminer les bactéries qui n'adhèrent pas. Les plaques ont été mises à sécher, après quoi le biofilm a été fixé avec de l'éthanol pendant une durée de 15 minutes.

Puis, les puits ont été teints avec 150 microlitres de violet de gentiane à 1% pendant 30 minutes.

On a éliminé le surplus de colorant en rinçant doucement à l'eau distillée, puis les plaques ont été mises à sécher à température ambiante.

Le colorant fixé a par la suite été solubilisé en utilisant 150 microlitres d'acide acétique glacé à une concentration de 33 % (v/v). (Beckman et al., 2024) .

### 8.2.2. Lecture de la microplaqué

La densité optique (DO) de chaque puits a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (SynergyMx, Bioteck™, Winooski, VT, USA).

- Non productrice de biofilm (-)  $DO \leq Doc$
- Faible production de biofilm (+)  $DO_c < DO \leq 2x DO_c$
- Production modérée de biofilm (++)  $2x DO_c < DO \leq 4x DO_c$
- Forte production de biofilm (+++)  $4x DO_c < DO$  (Hassan et al., 2011)

# **Chapitre 4**

# **Résultats et Discussion**

## 1.Résultats

### 1.1. Isolement

#### 1.1.1. Résultats Isolement

Ce travail expérimental a porté sur l'étude quarante-huit. (48) souches bactériennes. trente-neuf (39) des isolats étudiés appartenaient à l'espèce *Staphylococcus*, tandis que les (9) autres relevaient de la famille des *Entérobactéries*.

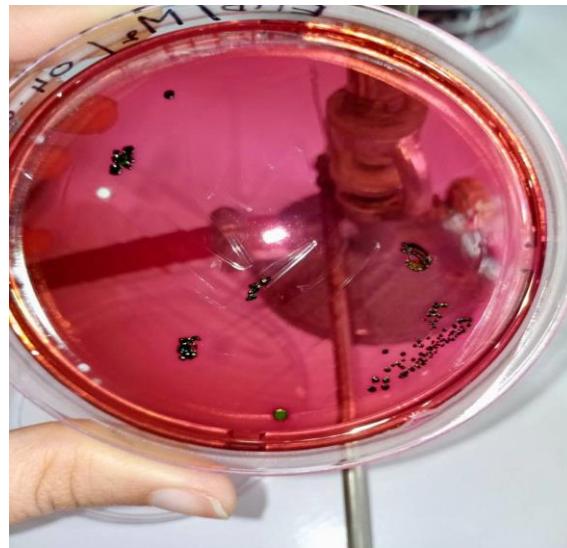
L'isolement et la purification de ces souches ont été effectués de façon ordonnée durant la phase de culture initiale en utilisant deux milieux sélectifs, EMB caractérisée par des colonies d'une couleur vert métallique (Sharma et al., 2023), et MacConkey, qui favorise la croissance exclusive des membres de la famille *Enterobacteriaceae* (Sharma et al., 2023).

après l'incubation des échantillons dans des conditions appropriées (37°C pendant 24 heures) pour favoriser une croissance visible des colonies bactériennes sur les milieux.

On a constaté que la morphologie et la densité des colonies bactériennes variaient (Figure 6) et (Figure 7) pour milieu EMB et (Figure 8) pour milieu MacConkey, après la phase de mise en culture, les souches ont été réensemencées dans des milieux similaires afin d'obtenir des colonies pures et sans contamination. Suite à cette étape, les isolats ont été préparés et ensuite entreposés dans des tubes contenant milieu de conservation appropriés en prévision de leur utilisation lors des divers essais de formation de biofilm.



**Figure 6.** aspect des *entérobactéries* sur milieu EMB (Photo Personnelles) .  
Source : Auteur, 2025



**Figure 7.** aspect des *entérobactéries* sur milieu EMB (Photo Personnelles) .

Source : Auteur, 2025



**Figure 8.** aspect des *entérobactéries* sur milieu MacConkey( PhotoPersonnelles) .

Source : Auteur, 2025

## 1.2. Identification

### 1.2.1. Résultats Identification par API20 E

Afin de préparer le test API 20E, cinq (5) souches bactériennes ont été cultivées sur le milieu SS (*Salmonella-Shigella*) et milieu MacConkey , et Après une période d'incubation de 24 heures à 37°C, des colonies ont été observées sur l'ensemble du milieu.

Par la suite, une suspension bactérienne est préparée à partir d'une colonie pure, prélevée sur un milieu approprié, et émulsionnée dans de l'eau physiologique stérile. Cette

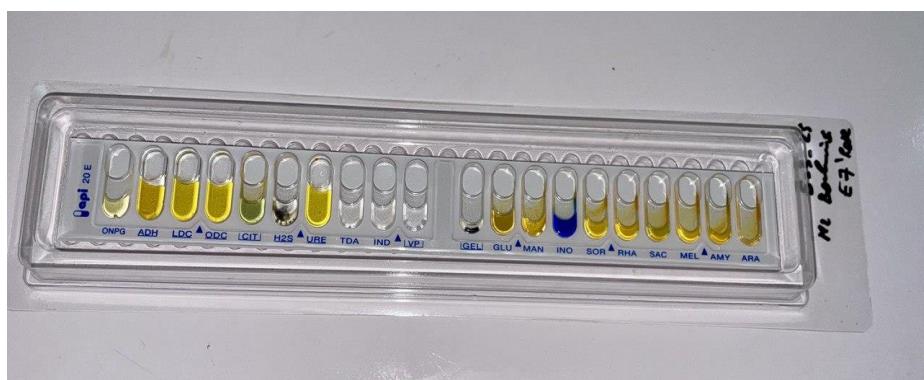
suspension est utilisée pour l'inoculation des galeries API 20E, en respectant strictement les conditions d'asepsie afin d'assurer la fiabilité des résultats.

Suite à une incubation de 24 heures, on intègre le réactif nécessaire et l'on obtient les résultats. Ces réactions biochimiques sont mises en comparaison et se voient attribuer des codes numériques.

Les galeries API 20E, après incubation, sont illustrées par les **figures 9 à 13** montrant les diverses réactions biochimiques observées pour chaque souche *d'entérobactérie*.



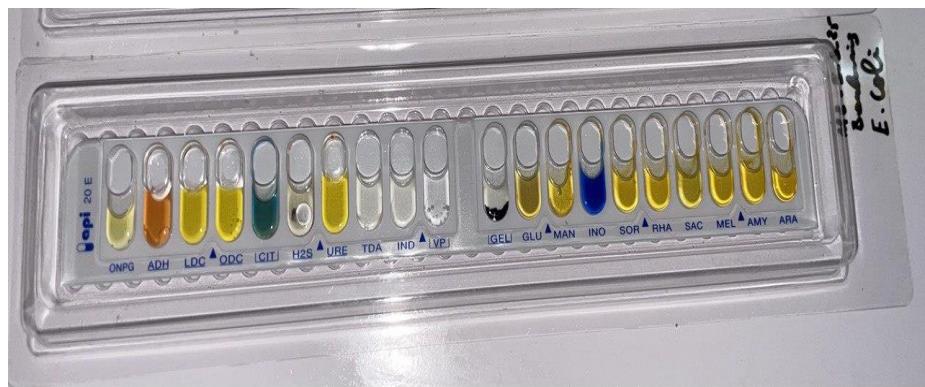
**Figure 9.** Résultat d'API20E *d'Enterobacter Sakazakii*  
Source : Auteur, 2025



**Figure 10.** Résultat d'API20E *d'Citrobacter freundii*  
Source : Auteur, 2025

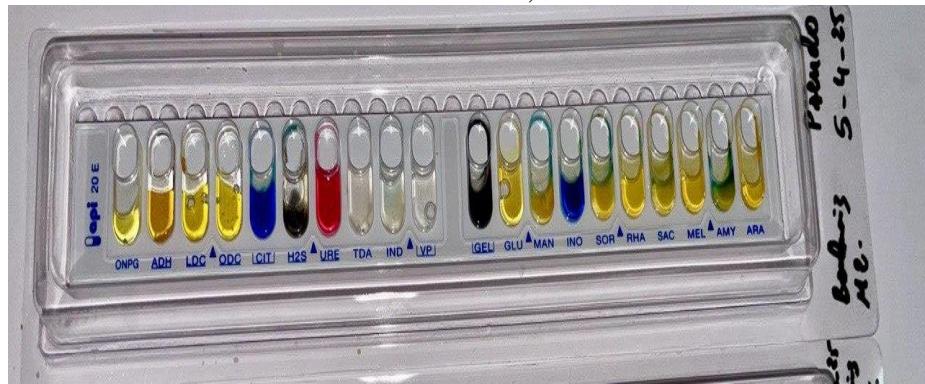


**Figure 11.** Résultat d'API20E *d'Rahnella aquatilis*.  
Source : Auteur, 2025



**Figure 12.** Résultat d'API20E *d'Enterobacter cloacae*

Source : Auteur, 2025



**Figure 13.** Résultat d'API20E *d'Salmonella spp.*

Source : Auteur, 2025

### 1.3 .Teste de mucoviscosité

#### 1.3.1. Résultats de Teste de mucoviscosité

Le test de mucoviscosité a été réalisé sur huit (8) souches *d'Entérobactéries* en utilisant un spectrophotomètre, après incubation des souches dans le milieu LB (Luria-Bertani) pendant 24 heures à 37°C. L'absorbance a été mesurée à 600 nm (DO600) avant et après centrifugation à 1000 g pour 5 minutes , afin d'évaluer le degré de mucoviscosité.

Les résultats ont montré une variation des valeurs enregistrées entre les souches, reflétant des niveaux différents de mucoviscosité. Les données ont été consignées dans un tableau .

**Tableau 2.**Résultats du test de mucoviscosité chez certaines souches *d'Entérobactéries*.

Les souches	Absorbance avantcentrifugeuse	Absorbance après centrifugeuse	$\frac{\text{Absorbance après centrifugeuse}}{\text{Absorbance avant centrifugeuse}} \times 100$
<i>Citrobacter freundii</i>	0,648	0,460	70,98 %
<i>Enterobacter Sakazakii</i>	1,174	0,140	11,92 %
<i>Salmonella</i>	1,624	0,051	3,14 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,747	0,010	1,33 %
E7'	0,905	0,022	2,43 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,686	0,233	33,96 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,390	0,181	13,02 %
<i>Rahnella aquatilis</i>	0,867	0,127	14,64 %

#### 1.4.Methodequalitatif sur l'Agar Rouge Congo (CRA)

##### 1.4.1. Résultats du test au rouge Congo

Le test a été réalisé sur toutes les souches des *entérobactéries* et des *staphylocoques*.en les cultivant sur le milieu Congo Red Agar (CRA). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, toutes les souches ont présenté des colonies de couleur rouge foncé, rose ou rouge rosé (figures 14, 15 et 16). Ces résultats indiquent que toutes les souches de *Staphylococcus* et *d'entérobactéries* sont négatives pour la production de biofilm.



**Figure 14.**Colonie rouge foncé de *staphylococcusspp* (Photo Personnelles ).

Source : Auteur, 2025



**Figure 15.**colonie rose clair d'un *staphylococcusspp* (photo personnelles ).

Source : Auteur, 2025



**Figure 16.** colonie rose d'un *staphylococcus spp* (photo personnelles ).

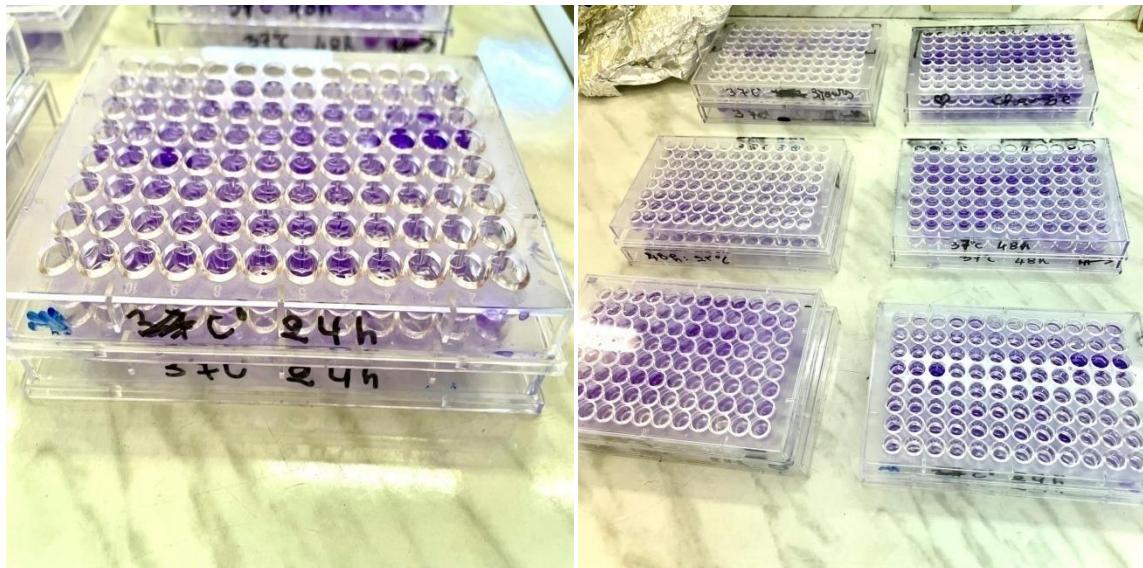
Source : Auteur, 2025

## 1.5. Methode Quantitative (Microtiter Plate Assay)

### 1.5.1. Résultats de formation de biofilm sur plaque à micropuits (Microtiter Plate Assay)

L'une des techniques les plus courantes et normalisées pour identifier la formation de biofilms est le test sur plaque de culture tissulaire (TCP) (Christensen et al., 1985, mentionné dans Mathur et al., 2006). Le test microplate a été réalisé pour évaluer la capacité de toutes les souches *d'Entérobactéries* et de *Staphylocoques* à former un biofilm. Le milieu approprié a d'abord été préparé et ajoutée dans les puits, puis la suspension bactérienne a été ajoutée aux puits du microplaqué.

Après l'incubation dans température (37°C) et durée différent(24H / 3 jours), l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm (OD595). (**figure 17**)



**Figure 17.** microplaques après incubation .

Source : Auteur, 2025

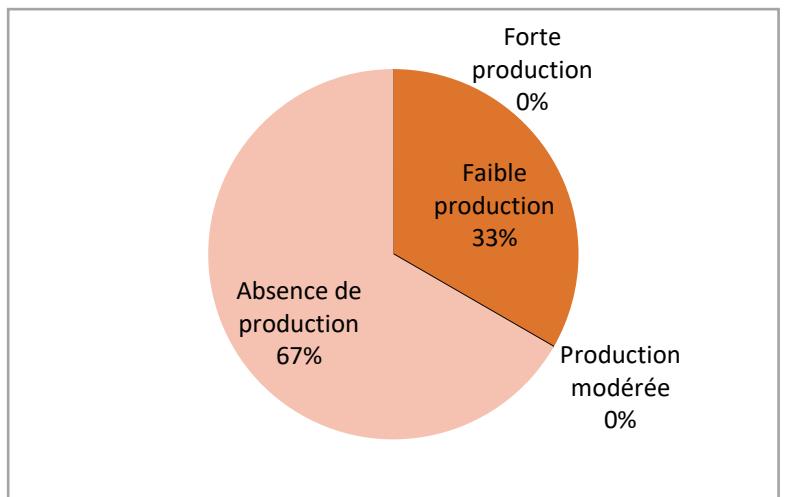
### 1.5.2. Lecture des résultats

Après la lecture des microplaques à une absorbance de 595 nm, les valeurs obtenues sont converties en pourcentages. La production de biofilm est ensuite classée en quatre catégories :

1. Absence de production de biofilm
2. Faible production de biofilm
3. Production modérée de biofilm
4. Forte production de biofilm

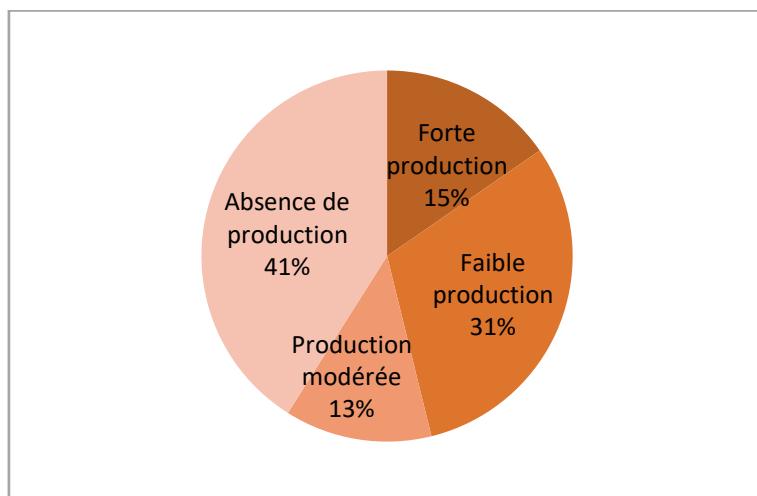
- Les Résultats obtenus :

• **Microplaques après 24 heures d'incubation à température 37 °C :**



**Figure 18.**Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches d'entérobactéries (24 h, 37°C).

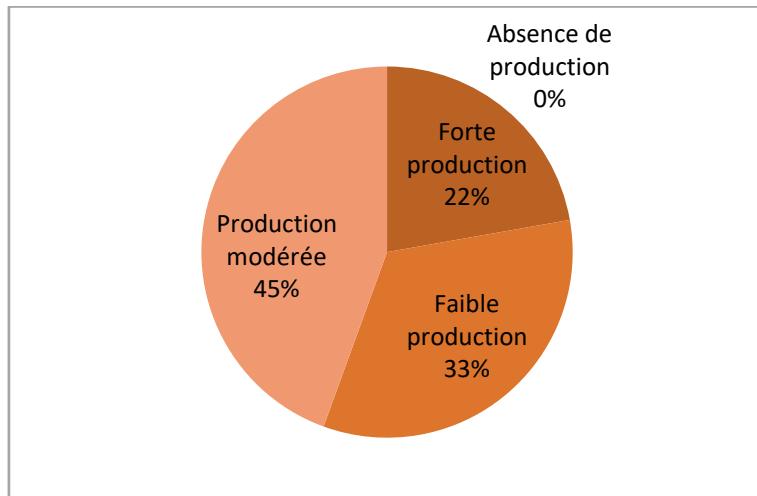
Source : Auteur, 2025



**Figure 19.**Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches de staphylocoques (24 h, 37°C).

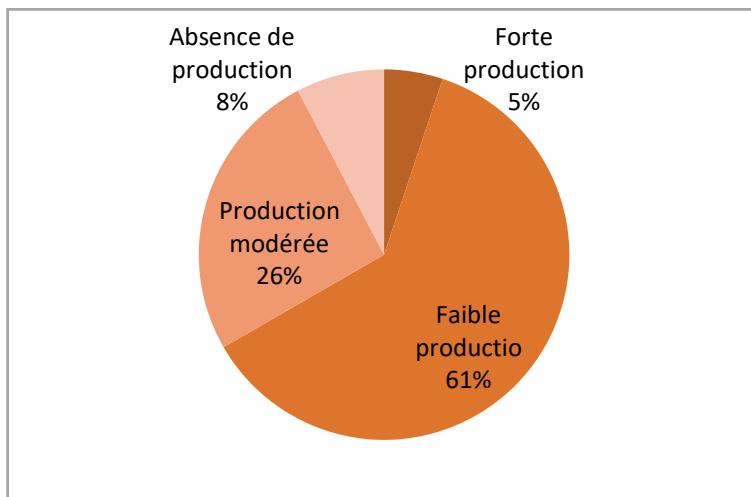
Source : Auteur, 2025

- Microplaques après 3 jours d'incubation à température 37°C :



**Figure 20.** Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches d'entérobactéries (3 jours, 37°C).

Source : Auteur, 2025



**Figure 21.** Répartition des pourcentages de production de biofilm par les souches de staphylocoques (3 jours, 37°C).

Source : Auteur, 2025

- Microplaques après 3 jours d'incubation à température 37°C avec renouvellement du milieu chaque jour :

Aucune souche a la capacité de produire biofilm ni *staphylococcus* ni *entérobactéries*.

**Tableau 3.**Résultats du test de formation de biofilm en microplaqué chez les *Staphylocoques* et les *Entérobactéries*.

Condition d'incubation	Type bactérien	Forte production	Production modérée	Faible production	Absence de production
24h à 37°C	<i>Entérobactéries</i> (n=9)	0 % (0/9)	0 % (0/9)	33,33% (3/9)	66,67% (6/9)
	<i>Staphylococcus</i> (n=39)	15,38% (6/39)	12,82% (5/39)	30,77 % (12/39)	41,03% (16/39)
3 jours à 37°C	<i>Entérobactéries</i> (n=9)	22,22% (2/9)	44,44% (4/9)	33,33% (3/9)	0 % (0/9)
	<i>Staphylococcus</i> (n=39)	5,13% (2/39)	25,64% (10/39)	61,54% (24/39)	7,69% (3/39)
3 jours à 37°C avec renouvellement du milieu chaque jour	<i>Entérobactéries</i> (n=9)	0 % (0/9)	0 % (0/9)	0 % (0/9)	100 % (9/9)
	<i>Staphylococcus</i> (n=39)	0 % (0/39)	0 % (0/39)	0 % (0/39)	100% (39/39)

### 1.6.Étude statistique de l'influence des conditions de culture sur la formation du biofilm par des *Staphylocoques* et *Entérobactéries* :

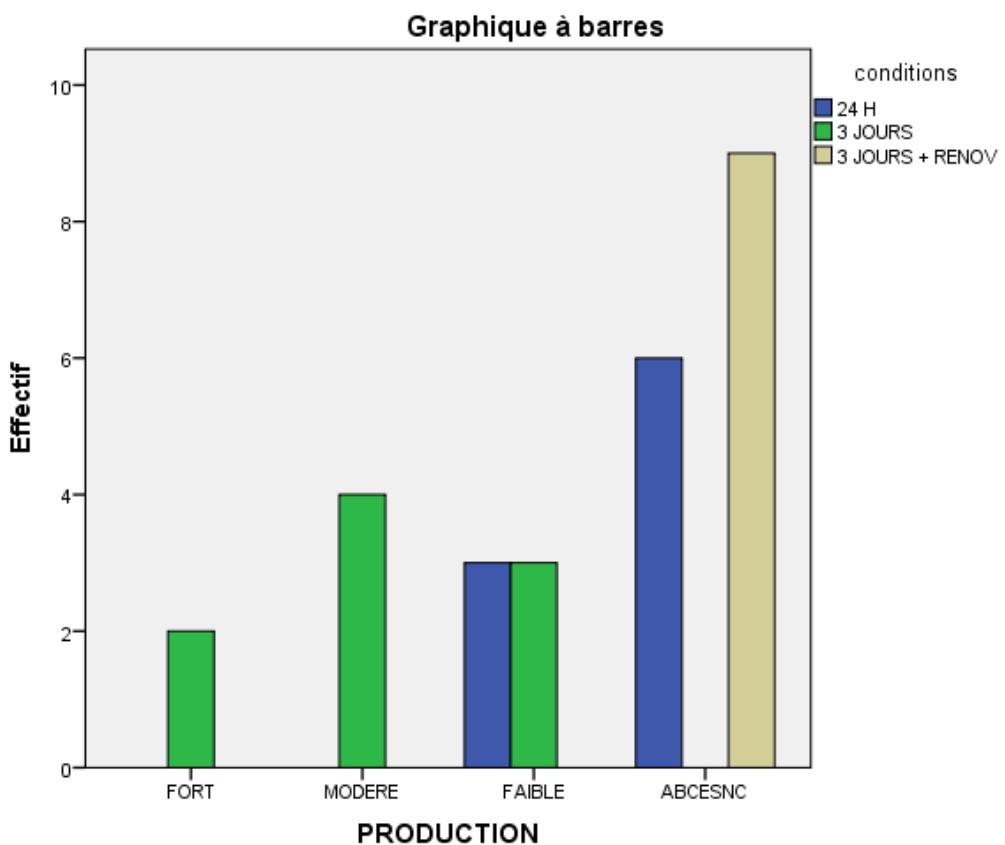
Le graphique en barres illustre la répartition des niveaux de production de biofilm chez neuf (9) souches d'*entérobactéries*, évaluées dans trois conditions d'incubation distinctes : après 24 heures, après 3 jours sans renouvellement du milieu, et après 3 jours avec renouvellement du milieu.

Un test du Khi<sup>2</sup> (Chi<sup>2</sup>) a été appliqué pour analyser l'association entre les conditions d'incubation et le niveau de production de biofilm, classé en quatre catégories : absence, faible, modérée et forte. Les résultats révèlent une association statistiquement significative entre ces deux variables ( $p = 0,001$ ), suggérant que la durée d'incubation ainsi que le renouvellement du milieu influencent significativement la capacité de formation du biofilm.

Après 24 heures d'incubation, la majorité des souches n'ont présenté aucune formation de biofilm, tandis qu'un petit nombre a montré une production faible, indiquant un stade initial d'adhésion ou une absence de mise en place de la matrice biofilmique.

À 3 jours sans renouvellement du milieu, une variabilité inter-souches a été observée, certaines souches présentant une augmentation notable de leur capacité à produire un biofilm. Ce résultat laisse penser que l'incubation prolongée dans un milieu non renouvelé pourrait favoriser l'accumulation de signaux quorum-sensing ou la stabilisation progressive de la matrice extracellulaire.

En revanche, après 3 jours avec renouvellement quotidien du milieu, aucune production de biofilm n'a été détectée. Ce résultat peut s'expliquer par la perturbation constante des conditions locales (nutriments, signaux chimiques, stabilité cellulaire), empêchant la consolidation d'une structure biofilmique. (Figure 22)



**Figure 22.** Production de biofilm chez les *entérobactéries* selon les conditions d'incubation.

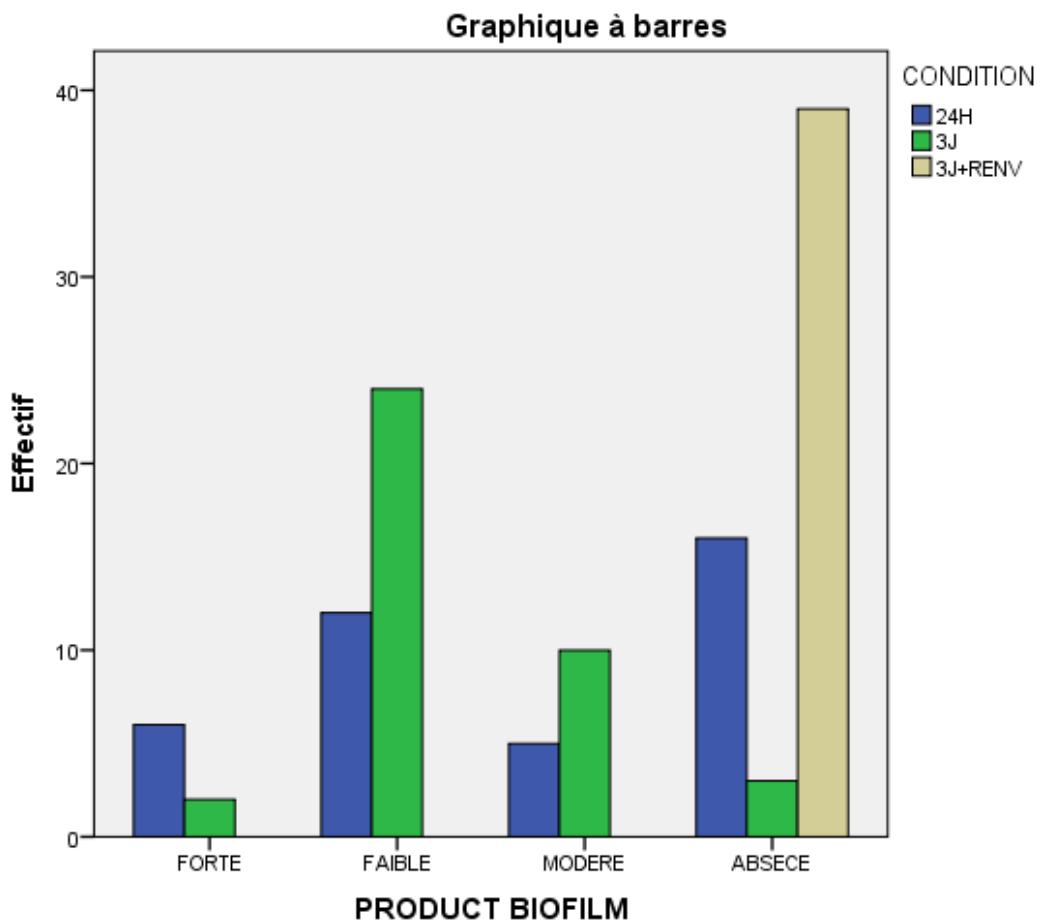
Le graphique en barres illustre la répartition des niveaux de production de biofilm chez 39 souches de *staphylococcus*, évaluées dans trois conditions d'incubation distinctes : après 24 heures, après 3 jours sans renouvellement du milieu, et après 3 jours avec renouvellement du milieu.

Un test du Khi<sup>2</sup> (Chi<sup>2</sup>) a été appliqué pour analyser l'association entre les conditions d'incubation et le niveau de production de biofilm, classé en quatre catégories : absence, faible, modérée et forte. Les résultats ont montré une relation hautement significative entre les deux variables ( $p < 0,001$ ), indiquant que la durée d'incubation et le renouvellement du milieu influencent significativement la capacité de formation du biofilm.

Après 24 heures d'incubation, l'ensemble des niveaux de production de biofilm ont été observés, allant de l'absence à une production forte. Cette diversité suggère que les souches de *staphylococcus* se trouvent à différents stades de développement du biofilm : certaines en sont encore au stade initial d'adhésion, tandis que d'autres ont déjà amorcé, voire atteint, une phase plus avancée de formation de la matrice biofilmique.

À 3 jours sans renouvellement du milieu, une variation des réponses a été observée : certaines souches ont montré une augmentation de la production par rapport à 24 heures, tandis que d'autres ont présenté une diminution. Ce résultat laisse penser que l'incubation prolongée dans un milieu non renouvelé pourrait favoriser l'accumulation de signaux quorum-sensing ou la stabilisation progressive de la matrice extracellulaire.

En revanche, après 3 jours avec renouvellement quotidien du milieu, aucune production de biofilm n'a été détectée. Ce résultat peut s'expliquer par la perturbation constante des conditions locales (nutriments, signaux chimiques, stabilité cellulaire), empêchant la consolidation d'une structure biofilmique. (Figure 23)



**Figure 23.** Production de biofilm chez les *staphylocoques* selon les conditions d'incubation.

## 2. Discussion :

On définit le biofilm comme une communauté microbienne constituée de groupes de cellules bactériennes qui adhèrent à une surface et sont confinées dans une matrice extracellulaire qu'elles ont produite elles-mêmes. Le biofilm joue un rôle crucial en tant que facteur de virulence et offre un milieu protecteur qui permet aux organismes de survivre (Harika et al., 2020).

Les agents antimicrobiens ont une efficacité intrinsèquement moindre contre les micro-organismes qui se développent dans un biofilm par rapport aux cellules planctoniques. Il faut des doses importantes d'agents antimicrobiens pour neutraliser les organismes qui se développent dans un biofilm, étant donné que leur résistance aux antibiotiques peut croître jusqu'à 1000 fois (Hassan et al., 2011).

elon Hassan et al. (2011), les bactéries gram-positives et gram-négatives sont toutes aptes à produire des biofilms. , les bactéries souvent associées comprennent *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* .

Notre recherche a pour objectif d'examiner le potentiel de diverses souches bactériennes (les *Staphylocoques* et les *Entérobactéries*), à établir un biofilm. Nous avons aussi mis l'accent sur l'évaluation de l'impact de deux éléments cruciaux dans cette démarche : le renouvellement du milieu de culture et la période d'incubation.

## 2.1. Isolement et Identification

Au cours de la première étape de l'étude, nous avons procédé à l'isolement et à l'identification des souches bactériennes en recourant à des milieux de culture sélectifs dont nous avons parlé auparavant.

Suite à l'isolation des bactéries, nous avons employé le système API20E. L'API 20E est un dispositif en plastique renfermant des microtubes gorgés de substrats déshydratés, initialement pensé pour l'identification des *Entérobactéries* (Enterobacteriaceae) (Shayegani et al., 1978).

Cette recherche a permis d'identifier cinq types différents *d'Entérobactéries*, en se basant sur les résultats du test API 20E. Les études ont mis en évidence une grande variété parmi les espèces isolées, incluant l'identification *d'Enterobactercloacae*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii* et une souche classifiée sous *Salmonella spp.*

Cette variété démontre la diversité intrinsèque des espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae.

## 2.2. Test de mucoviscosité

Ce test a servi à évaluer le degré de mucoviscosité (mucoviscosité) d'un groupe de souches bactériennes en évaluant la densité optique (DO<sub>600</sub>) avant et après une centrifugation de 5 minutes à 1000 × g. Les résultats ont mis en évidence des disparités nettes entre les variétés examinées. La variante *Citrobacter freundii* a montré le taux le plus haut de 70,98 %, indiquant une mucoviscosité importante. Par contre, la souche de *Salmonella* a montré un faible taux de 3,14 %, tandis que la souche *Enterobacter cloacae* a affiché un pourcentage de 1,33 %, signalant une production minime de matière mucoïde. D'autres souches ont présenté des pourcentages moyens comme E7 à 33,96 %, *Rahnella aquatilis* à 14,64 % et *Enterobacter*

*cloacae* à 13,02 %. La souche *Enterobacter sakazakii* a démontré un pourcentage de 11,92%, signifiant une mucoviscosité moyenne, alors que la souche E7' a présenté un taux de 2,43%, témoignant d'une faible production de matière mucoïde. Ainsi, l'application de cette méthode permet de différencier les souches à mucoviscosité élevée de celles à mucoviscosité faible.

Les résultats du test de mycoviscosité ont révélé une variation nette entre les souches étudiées, reflétant ainsi une diversité phénotypique considérable dans la production de substance mucoïde.

Dans l'étude menée par Beckman et ses collègues (2024), il a été souligné que la viscosité mucoïde n'est pas nécessairement liée à la présence du gène régulateur *rmpA*, mais pourrait résulter d'autres mécanismes génétiques ou phénotypiques. Nos résultats concordent avec ceux observés par Beckman et ses collaborateurs dans leur étude sur *Klebsiella pneumoniae*, où un petit nombre de souches présentaient des niveaux élevés de viscosité mucoïde, tandis que la majorité montrait des niveaux faibles à modérés.

L'étude a également révélé une relation inverse entre une viscosité mucoïde élevée et la capacité des souches à former un biofilm, suggérant que la capsule épaisse pourrait entraver l'adhésion des bactéries aux surfaces, empêchant ainsi la formation de structures biofilmées. Toutefois, quelques exceptions ont été signalées, où des souches hautement mucoïdes ont réussi à surmonter cet obstacle et à former un biofilm robuste, ce qui indique l'existence possible de mécanismes compensatoires. (Beckman et al., 2024)

Dans notre étude, il a été observé que *Citrobacter freundii* présentait un niveau élevé de viscosité mucoïde, ce qui pourrait indiquer une faible capacité de production de biofilm. En revanche, *Salmonella* produisait une faible quantité de substance mucoïde, ce qui pourrait refléter une forte capacité à former un biofilm. Ainsi, le test de mycoviscosité constitue un outil efficace pour distinguer les souches selon leur aptitude à la sécrétion mucoïde, tout en contribuant à une prédition relative de leur capacité à former un biofilm, ce qui pourrait s'avérer d'une grande importance pour la compréhension des caractéristiques de virulence et de colonisation des différentes isolats bactériens.

### 2.3. Test qualitatif avec l'Agar Rouge Congo (CRA)

Dans le cadre de notre recherche, nous avons constaté que tous les isolats bactériens examinés n'ont pas produit de biofilm en utilisant la technique du Congo Red Agar (CRA). Ces résultats totalement négatifs suggèrent soit un absence de capacité à créer des biofilms

chez les isolats étudiés, soit ils pourraient mettre en évidence les contraintes de la technique employée pour identifier ce processus.

Dans une recherche effectuée par Harika et al. (2020), les auteurs ont démontré que la technique CRA n'est pas assez précise pour détecter la formation de biofilm par rapport à d'autres techniques, car elle n'a reconnu que 51 isolats sur 92 comme producteurs de biofilm, présentant une sensibilité faible (56,9 %) et une spécificité de (50 %), ce qui a entraîné un grand nombre de faux négatifs.

Ils ont également indiqué que la CRA présentait une meilleure corrélation avec les isolats Gram positif comparativement aux isolats Gram négatif, ce qui pourrait affecter la précision de la détection en fonction du type d'isolat.

De plus, on ne considère pas la méthode CRA comme un outil fiable pour la détection du biofilm, étant donné qu'elle n'a pu identifier que 3,8 % des isolats de *\*Staphylococcus aureus\** comme producteurs de biofilm, en comparaison avec 57,1 % via la méthode conventionnelle TCP, ce qui souligne la sensibilité restreinte de cette approche. (Harika et al., 2020).

On peut également interpréter les résultats négatifs en s'appuyant sur l'étude de Freeman et al. (1989), qui a indiqué que le processus de réaction du rouge Congo reste encore partiellement incompris, et que le changement de couleur peut ne devenir apparent qu'aux stades avancés de l'incubation. Cela suggère une possible implication d'un métabolite secondaire dans cette réaction.

De plus, l'étude a montré que l'utilisation de 5 % de saccharose ou de glucose est nécessaire pour détecter la formation du biofilm.

D'après Nair et Megha (2020), le test de l'Agar Congo Red (CRA) a révélé la sensibilité la plus faible (14,6 %) comparativement aux autres techniques, ce qui a engendré une importante proportion de faux négatifs, notamment parmi les isolats de *staphylocoques*. Par contre, l'essai de microplaqué à fond plat (TCP) a été le plus réactif (68,8 %) et est considéré comme la méthode standard pour identifier la formation de biofilm. Ces conclusions indiquent que la technique CRA pourrait ne pas être adéquate, surtout pour l'identification du biofilm chez les bactéries Gram négatif.

#### 2.4. Test de formation de biofilm en utilisant une plaque à micropuits (Essai sur plaque à micropuits)

Des bactéries ont été introduites dans des microplaques, où elles ont été placées en incubation à 37°C pendant une durée de 24 heures. Au-delà de cette période, des variations dans la formation du biofilm ont été notées parmi les différentes souches. Concernant les souches *d'Entérobactéries*, leur aptitude à former un biofilm était généralement faible, avec 66,67 % d'entre elles ne générant aucun biofilm et 33,33 % montrant seulement une faible production. Aucune des souches n'a démontré une production élevée ou moyenne de biofilm, ce qui signifie que la formation de biofilm au sein de ce groupe est très faible après une incubation de 24 heures à 37 degrés Celsius.

Pour les souches de *Staphylocoque*, la production de biofilm présentait une plus grande variation. Une petite fraction, à savoir 15,38 %, a démontré une capacité à produire un biofilm fort, alors que 12,82 % produisaient un biofilm modéré. 30,77 % ont montré une faible production, tandis que 41,03 % n'ont généré aucun biofilm. Ces résultats soulignent la variation dans l'aptitude de ces souches à former du biofilm.

Ces résultats révèlent une variation substantielle dans la capacité des différentes souches à produire du biofilm dans les mêmes conditions. La recherche réalisée par Hou et ses collaborateurs (2012) a mis en évidence des divergences significatives dans la capacité de différentes souches bactériennes à créer des biofilms dans des conditions de laboratoire identiques.

Un ensemble de 96 souches de *Staphylococcus epidermidis*, 27 souches de *Staphylococcus aureus* et 29 souches de *Pseudomonas aeruginosa* prélevées à partir d'infections oculaires. Il a été noté que 28,13 % des souches de *S. epidermidis* et 51,90 % des souches de *S. aureus* démontraient une capacité positive à produire des biofilms selon le test en microplaques (microtiter plate assay), alors qu'aucune souche de *P. aeruginosa* ne manifestait cette aptitude. Ces observations attestent de la forte variabilité dans la capacité à former des biofilms, même au sein d'une même espèce bactérienne (Hou et al., 2012).

Dans le second cas, les échantillons ont été maintenus à une température de 37 °C pendant trois jours. Les souches *d'Entérobactéries* ont démontré une production de biofilm variable, où 22,22 % générèrent un biofilm fort, 33,33 % un biofilm faible et 44,44 % un biofilm modéré. Notons qu'aucune souche n'a montré une absence totale de production. Concernant les souches de *Staphylocoque*, une grande disparité a été constatée en matière de

formation de biofilm : 5,13 % des échantillons ont produit un biofilm fort, 61,54 % un biofilm faible, 25,64 % un biofilm modéré, alors que 7,69 % n'ont produit aucun biofilm. Ces observations mettent en évidence l'influence bénéfique de l'extension du temps d'incubation sur la formation du biofilm, particulièrement pour certaines souches qui requièrent un délai plus long pour former un biofilm.

Selon une recherche réalisée par Sharma et al. (2023), l'évolution du biofilm chez *Escherichia coli* (*E. coli*) a été observée sur une période de trois jours en utilisant un milieu LBGM modifié. On a constaté que la formation du biofilm débutait au bout de 24 heures, avec une croissance notable après 48 heures, et un biofilm épais qui recouvre entièrement le milieu dès le troisième jour. Même si nos observations n'ont pas démontré ce degré élevé de formation chez toutes les souches, il convient de noter que l'allongement de la durée d'incubation a aidé à renforcer la capacité de certaines souches à former un biofilm plus consistant.

Pour le troisième cas, les échantillons ont été placés en incubation pendant trois jours à une température de 37°C, avec un changement quotidien du milieu. Durant toute la durée de l'incubation, aucune des souches examinées n'a démontré une aptitude à créer un biofilm, ce qui signifie qu'il n'y a eu aucune formation de biofilm dans ces conditions expérimentales.

L'étude a démontré que la substitution de 50% du milieu (et pas de l'intégralité) a permis de préserver le biofilm des *streptocoques pneumoniae* pendant une durée de 5 jours (Trapetti et al., 2011). Dans notre recherche, l'absence de biofilm suite à un lavage intégral pourrait illustrer la nécessité de ces souches pour des signaux persistants ou des éléments matriciels ôtés par le nettoyage complet.

Dans une recherche portant sur la bactérie *Escherichia coli*, les chercheurs ont découvert que le développement du biofilm était plus constant et reproductible dans un environnement déficient en nutriments (sM9) par rapport à l'environnement riche (LB). Après avoir effectué le renouvellement du milieu (replenishment) après 24 heures et laissé les bactéries se développer encore pendant une journée, ils ont noté que certaines souches intensifiaient leur production de biofilm, alors que d'autres n'étaient pas influencées. Cela indique que la capacité des bactéries à créer un biofilm est influencée par le renouvellement de l'environnement, mais que cette influence dépend de la souche (Luther et al., 2015).

## 2.5. Comparaison de la capacité des *Staphylocoques* et des *Entérobactéries* à former un biofilm sous différentes conditions d'incubation

La comparaison entre les trois cas met en évidence des divergences nettes dans l'aptitude des souches à former un biofilm. Suite à une incubation de 24 heures à une température de 37 °C, 66,67 % des souches *d'entérobactéries* n'ont pas démontré de production de biofilm, tandis que 33,33 % ont manifesté une faible production. Par contre, les souches de *staphylocoques* ont montré des résultats variés, de l'absence totale de production (41,03 %) à une production considérable (15,38 %).

Lors de l'extension de la période d'incubation à trois jours à une température constante de 37°C, on a noté un changement significatif, particulièrement en ce qui concerne les *entérobactéries*. Dans cette situation, aucune souche n'a démontré une absence de production de biofilm, et 22,22 % d'entre elles ont affiché une production forte, ce qui constitue une amélioration notable par rapport à la première instance. En ce qui concerne les *staphylocoques*, une diminution du taux de production élevée a été observée (5,13 %), alors que le taux de production faible a grimpé à 61,54 %, et le taux de production modéré à 25,64 %. Cela démontre que l'extension de la période d'incubation a eu un impact bénéfique sur certaines souches, et met en évidence que certaines nécessitent plus de temps pour commencer à produire du biofilm.

Dans le troisième cas, où l'incubation a eu lieu pendant trois jours à 37 °C avec un changement quotidien du milieu, aucune souche n'a réussi à former un biofilm. Cela démontre que le renouvellement constant du milieu durant toute la durée de l'incubation a eu une incidence défavorable sur la capacité des souches à produire un biofilm.

Cette recherche révèle la vaste variabilité des capacités des souches bactériennes à former un biofilm sous diverses conditions expérimentales en laboratoire. Des études ont démontré que le temps d'incubation a un effet notable sur la création du biofilm, avec une amélioration de la capacité de certaines souches à produire un biofilm dense suite à une incubation prolongée de trois jours à 37 °C sans renouvellement du milieu nutritif.

En revanche, lors du renouvellement quotidien du milieu nutritif pendant la même période d'incubation, les souches n'ont pas pu former de biofilm. Ces résultats attestent que des éléments environnementaux tels que le temps d'incubation et la fréquence de renouvellement du milieu ont un impact significatif sur la capacité des bactéries à former des couches de biofilm.

# Conclusion

### CONCLUSION

Dans cette recherche, nous avons examiné la capacité de certaines variétés de *staphylocoques* et *d'entérobactéries* à former un biofilm par le biais de diverses épreuves, et en étudiant l'influence du temps d'incubation et du rafraîchissement du milieu de culture sur cette formation, compte tenu de son risque potentiel dans le secteur alimentaire. Nous avons débuté par l'examen de la formation du biofilm chez ces souches en utilisant le test de viscosité mucoïde, qui a révélé une différence dans la capacité des souches. *Citrobacte rfreundii* s'est caractérisée par une production élevée de substances mucoïdes, témoignant d'une forte aptitude à l'adhésion et à la formation de biofilm, alors que *Salmonella* a présenté une capacité relativement inférieure.

Par la suite, nous avons mis en œuvre le test de l'agar rouge Congo (CRA) afin d'évaluer la formation du biofilm. Toutefois, tous les échantillons examinés ont donné des résultats négatifs, les colonies étant de teinte claire et sans la teinte noire typique associée à la création de biofilm, ce qui suggère une absence ou une faible aptitude à produire selon ce test. Ces observations indiquent que le test CRA pourrait ne pas être adéquat pour identifier la capacité des souches examinées à former un biofilm, ou que toutes les souches n'en ont pas générée.

Par la suite, nous avons mis en œuvre le test sur microplaques afin de mesurer la quantité de biofilm produite. Ce test a démontré une variation selon les conditions d'incubation. Suite à une incubation de 24 heures, on a constaté une variation allant de faible à moyenne et parfois fort. Au bout de trois jours, certaines souches ont démontré un biofilm plus intense par rapport à celui créé après 24 heures, alors qu'aucune souche n'a présenté de capacité à produire un biofilm lors du changement quotidien du milieu pendant une période de trois jours.

À la fin de notre étude, nous confirmions la validité des deux hypothèses proposées, sur la base des résultats obtenus. La première hypothèse, selon laquelle la durée d'incubation influence la formation du biofilm, a été confirmée, puisque nous avons observé une augmentation de la formation du biofilm chez certaines souches au fil du temps. Quant à la deuxième hypothèse, stipulant que le renouvellement du milieu influence l'intensité et la structure du biofilm, elle a également été vérifiée. En effet, aucune souche n'a formé de biofilm après le renouvellement du milieu, ce qui indique l'impact considérable de ce facteur.

# Références bibliographiques

## Référence Bibliographiques

---

### A

- Abbott, S. L. (2007). Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (9th ed., pp. 698-711). ASM Press.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhuister, P., & Chihib, N. E. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020, Article ID 1705814. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
- Abebe, G.M. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. \*International Journal of Microbiology, 2020\*, Article ID1705814. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
- Alotaibi, G. F., & Bukhari, M. A. (2021). Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 12(6). <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2021.12.001820>
- Aryal, S. (2022, mai 2). Baird Parker Agar – Composition, Principle, Preparation, Results, Uses. *Microbe Notes*. <https://microbenotes.com/baird-parker-agar/>
- Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. (1992). Enterobacteriaceae. In *Bactériologie clinique* (2nd ed., pp. 149-196). Paris:Author. ISBN 2-7298-9218-4.

### B

- Basmaci, R., & Cohen, R. (2018). Que doit savoir le pédiatre sur Escherichia coli producteur de bêta-lactamase à spectre étendu. *Médecine de l'enfant au quotidien: Perfectionnement en Pédiatrie*.
- Bakhoum, I. (2004). Contrôle de qualité et validation de différentes micro méthodes d'identification.
- Beckman, R. L., Cella, E., Azarian, T., Rendueles, O., & Fleeman, R. M. (2024). Diverse polysaccharide production and biofilm formation abilities of clinical Klebsiella pneumoniae. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 10, Article 151. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00629-y>

## Référence Bibliographiques

---

•BioMérieux. (2010, mai). API 20 E Manual (Version française, 13 p.). Repéré à file:///C:/Users/ASUS/Documents/ETUDE/Thése/Articles%20et%20livres%20THESE/API20 E\_2.pdf

•Burke, D. (n.d.). Selective and differential media – MacConkey, EMB, MSA. In Bio 221 Lab: Introduction to Microbiology. LibreTexts.

[https://bio.libretexts.org/Courses/College\\_of\\_the\\_Canyons/Bio\\_221Lab%3A\\_Introduction\\_to\\_Microbiology\\_%28Burke%29/22%3A\\_Physiological\\_Tests\\_for\\_Characterization\\_and\\_Identification\\_of\\_Bacteria/22.02%3A\\_Selective\\_and\\_Differential\\_Media\\_-\\_MacConkey\\_EMB\\_MSA](https://bio.libretexts.org/Courses/College_of_the_Canyons/Bio_221Lab%3A_Introduction_to_Microbiology_%28Burke%29/22%3A_Physiological_Tests_for_Characterization_and_Identification_of_Bacteria/22.02%3A_Selective_and_Differential_Media_-_MacConkey_EMB_MSA)

## C

•Canellas, A. L. B., de Oliveira, B. F. R., Nunes, S. d. O., Malafaia, C. A., Amaral, A. C. F., Simas, D. L. R., Leal, I. C. R., & Laport, M. S. (2023). Delving into the mechanisms of sponge-associated Enterobacter against staphylococcal biofilms. *Molecules*, 28(12), 4843. <https://doi.org/10.3390/molecules28124843>

•Chen, Y. S., Wong, W., Fung, C. P., Yu, K., & Liu, C. Y. (2002). Clinical features and antimicrobial susceptibility trends in *Citrobacterfreundii* bacteremia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 35(2), 109-114.

•Costerton J W., Stewart P S et Greenberg E P. (1999). Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

## D

•David, B. (2010). Étude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré (Thèse de doctorat en médecine, Université Denis Diderot – Paris VII).

•De Chalvet De Rochemonteix A. (2009) Les biofilms et la peau. Thèse de doctorat, École vétérinaire de Maisons-Alfort.

•Donlan R M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.

•Dunne W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical microbiology reviews*. 15(2): 155-166.

### F

- Filloux A., et Vallet I. (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*, 19(1), 77-83.
- Fleming, D., &Rumbaugh, K. P. (2017). Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- Fraser, S. L., Arnett, M., &Sinave, C. P. (2010). Enterobacter infections. In C. Cunha (Ed.), *Medicine: Infectious Diseases* (University of New York School of Medicine at Stony Brook).
- 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>

### G

- Ghernaout-Benchouk, S. (2013). Prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus*: Son rôle dans l'infection du site opératoire (Thèse de doctorat en sciences médicales, Université Abou BekrBelkaid – Tlemcen). Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Algérie.
- Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M., & Pasquier, C. (2016). Bactériologie et virologie pratique (3rd ed., p. 128).

### H

- Harika, K., Shenoy, V. P., Narasimhaswamy, N., &Chawla, K. (2020). Detection of biofilm production and its impact on antibiotic resistance profile of bacterial isolates from chronic wound infections. *Journal of Global Infectious Diseases*, 12(3), 129–134. [https://doi.org/10.4103/jgid.jgid\\_150\\_19](https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_150_19)
- Hart, C. (2006). *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, and *Serratia* spp. In *Principles and practice of clinical bacteriology* (2nd ed., p. 386). John Wiley & Sons Ltd.
- 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.

## Référence Bibliographiques

---

- Hennekinne, J.-A. (2009). Nouvelles approches pour la caractérisation des toxic-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive (Thèse de doctorat en sciences, AgroParisTech). AFSSA LERQAP, Maisons-Alfort, France.
- Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(9), 5624–5631. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9114>

### J

- Joly, B., & Reynaud, A. (2002). Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. Éditions Doe et Éditions Médicales Internationales. p. 356.

### K

- Kaplan J Á. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research*, 89(3), 205-218.
- Khatoon Z., McTiernan C D., Suuronen E J., Mah T F., et Alarcon E I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12), e01067.
- Khennouchi, N. C. E. H. (2016). Évaluation de l'antibiorésistance du genre *Enterobacter* aux antibiotiques (Thèse de doctorat en sciences, Université Badji Mokhtar – Annaba).
- Kara Terki, I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen (Thèse de doctorat en sciences, Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen).
- Khennouchi, N. C. E. H. (2016). Évaluation de l'antibiorésistance du genre *Enterobacter* aux antibiotiques (Thèse de doctorat en sciences, Université Badji Mokhtar – Annaba).
- Khalil, M. A., Alorabi, J. A., Al-Otaibi, L. M., Ali, S. S., &Elsilk, S. E. (2023). Antibiotic resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from urinary tract infections. *Pathogens*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010034>

## Référence Bibliographiques

---

### L

•Lebeaux, D., &Ghigo, J.-M. (2012). Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ?

•. Lebeaux D, Ghigo J M (2012). Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles? *Med Sci (Paris)* 28:727-39.

•Lebeaux D., Lucet J C., et Barbier F S. (2016). Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm: implications en réanimation. *Réanimation*, 25(3), 308-317.

•Luther, M. K., Daffinee, K. E., &LaPlante, K. L. (2015, September 18). Effect of minimal medium replenishment on *Escherichia coli* biofilm. Presented at the 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Diego, CA. Available from <https://web.uri.edu/pharmacy/meet/effect-of-minimal-medium-replenishment-on-escherichia-coli-biofilm/>

### M

•Mahami T., Adu-Gyamfi A. (2011). Biofilm-associated infections: public health implications. *Inter. Res. J. Microbiol*, 2(10), 375-381.

•Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of MedicalMicrobiology*, 24(1), 25–29.

•Minor, L. (1989). Bactériologie médicale. Éditions Science, Paris, 333-318, 773-823.

•Monsel A., Le Corre M., Deransy R., Brisson H., Arbelot C., Vézinet C., et Langeron circuit, quel ventilateur?. *Anesthésie & Réanimation*, 4(2), 180-189. O. (2018). «La ventilation mécanique: de la physiologie à la pratique»: quelle sonde, quel

### N

•Nair, S., &Megha, S. (2020). Evaluation of various methods for detecting biofilm formation in clinical isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(6), 2761–2770.

<https://www.ijcmas.com/9-6-2020/Shruti%20Nair%20and%20S.%20Megha.pdf>

## Référence Bibliographiques

---

- Nyenje, M. E., Green, E., &Ndip, R. N. (2013). Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules*, 18(8), 9582–9593. <https://doi.org/10.3390/molecules18089582>

## P

- Pantel, A. (2015). Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques : Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST13 (Thèse de doctorat, Microbiologie). Université de Montpellier. p. 244.
- Pepperell, C., Kus, J., Gardam, M. A., Humar, A., & Burrows, L. (2002). Low-virulence *Citrobacter* species encode resistance to multiple antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 55-60.
- Phillips P L., Wolcott R D., Fletcher J., et Schultz G S. (2011). Biofilms Made Easx. *Wounds International* 2010; 1 (3). Available at: [bit.ly/ICJUTUX](http://bit.ly/ICJUTUX) (accessed February 2016).
- Prescott, W., & Sherwood, W. (2010). *Microbiologie* (3rd ed., p. 559). De Boeck Supérieur. ISBN 9782804160128.

## R

- Rebiahi, S. A. (2012). Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (Thèse de doctorat en sciences, Université de Tlemcen).
- Roux A., Ghigo J M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Ryan, K. J. (2004). *Enterobacteriaceae*. In *Sherris Medical Microbiology: An introduction to infectious diseases* (4th ed., p. 992). McGraw-Hill.

## S

- Sauer K., Camper A K., Ehrlich G D., Costerton J W., et Davies D G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1140-1154.

## Référence Bibliographiques

---

- Sharma, S., Jhalora, V., Mathur, S., &Bist, R. (2023). A comparison of antibiotics' resistance patterns of *E. coli* and *B. subtilis* in their biofilms and planktonic forms. *Infectious Disorders - Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/0118715265278809240101073539>
- Shayegani, M., Maupin, P. S., &McGlynn, D. M. (1978). Evaluation of the API 20E system for identification of nonfermentative gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(6), 539–545.
- Stiles, M. E., & Ng, L.-K. (1981). Use of Baird-Parker's medium to enumerate *Staphylococcus aureus* in meats. *Journal of Food Protection*, 44(8), 583–587.

## T

- Touaitia, R. (2016). *Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline : Emergence et mécanismes de résistance* (Thèse de doctorat en sciences, Université Badji Mokhtar – Annaba).

- Trapretti, C., et al. (2011). *BMC Microbiology*, 11, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-75>

- Tremblay Y D., Hathroubi S., et Jacques M. (2014). Les biofilms bactériens : 1er importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.

## V

- Van Houdt R., Michiels C W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*, 156(5-6), 626-633.

- Viçosa, G. N., Moraes, P. M., Yamazi, A. K., & Nero, L. A. (2010). Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiology*, 27(4), 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.12.007>

## W

- Wang, A., Yang, Y., Lu, Q., et al. (2008). Présence de gène *qur* chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* résistants à la ciprofloxacine isolés de patients pédiatriques en Chine. *Journal*, 8, 68.

تهدف هذه الدراسة إلى فحص قدرة سلالات مختلفة من *Staphylococcus* و *Entérobactéries* على تكوين البيوفيلم، باستخدام اختبارات مختلفة، وتحليل تأثير مدة الحضانة وتغيير وسط الزرع على هذا التكوين. بدأنا دراستنا بتحليل الزوجة المخاطية، مما كشف عن تنوع في قدرة السلالات. وقد تميزت *Citrobacter freundii* بـ*Salmonella* المكثف للمادة المخاطية، مما يدل على قدرة عالية على الالتصاق وتكوين البيوفيلم، في حين ظهرت *Salmonella* قدرة أقل. بعد ذلك، أجرينا اختبار أغار الكونغو الأحمر (CRA)، وكانت النتائج سلبية، حيث لم نلاحظ أي تغير في لون المستعمرات بشير إلى تكوين بيوفيلم. بعد ذلك، استخدمنا اختبار الألواح الدقيقة لقياس كمية البيوفيلم، ولاحظنا تقلبات في الإنتاج حسب مدة الحضانة؛ وبعد 24 ساعة من الحضانة، تراوحت النتائج بين منخفضة ومتوسطة وأحياناً مرتفعة، ثم اتجهت إلى الزيادة أكثر بعد 72 ساعة لبعض السلالات. ومع ذلك، فإن التجديد اليومي للوسط لمدة ثلاثة أيام أدى إلى غياب تكوين البيوفيلم لجميع السلالات. تشير هذه المعلومات إلى أن مدة الحضانة تعزز تطوير البيوفيلم، بينما يعيق التجديد المنتظم للوسط تكوينه.

**الكلمات المفتاحية :** *Citrobacter freundii* ، *Entérobactéries* ، *staphylococcus* ، الزوجة المخاطية ، البيوفيلم ، اختبار CRA ، اختبار أغار الكونغو الأحمر (CRA) ، اختبار الميكروبلاط ، وقت الحضانة ، تجديد الوسط ، *Salmonella* ،

## Résumé

Cette recherche a pour objectif d'examiner le potentiel de diverses souches de *Staphylococcus* et *Entérobactéries* à créer un biofilm, en recourant à divers tests, et d'analyser l'effet du temps d'incubation et du changement du milieu de culture sur cette formation. Nous avons débuté notre étude par l'analyse de la mucoviscosité, révélant une diversité dans le potentiel des souches. *Citrobacter freundii* s'est démarquée par sa production intense de substance muqueuse, témoignant d'une forte capacité d'adhésion et de formation de biofilm, alors que *Salmonella* a démontré un potentiel moindre. Par la suite, nous avons réalisé le test sur Agar Congo Red (CRA) et les résultats se sont révélés négatifs, puisque nous n'avons noté aucun changement de couleur des colonies pour signaler la création d'un biofilm. Par la suite, nous avons eu recours au test en microplaques pour quantifier le biofilm, et nous avons observé des fluctuations de production en fonction de la durée d'incubation ; après 24 heures d'incubation, les résultats allaient de bas à moyen et occasionnellement élevé, puis ont tendance à augmenter davantage après 72 heures pour certaines souches. Toutefois, le renouvellement journalier de l'environnement sur une période de trois jours a résulté en l'absence de formation de biofilm pour toutes les souches. Ces informations indiquent que la durée d'incubation favorise le développement du biofilm, alors que le renouvellement régulier de l'environnement en freine la formation.

**Mots-clés :** *Staphylococcus* , *Entérobactéries* , biofilm , mucoviscosité , *Citrobacter freundii* , *Salmonella* , test CRA , test en microplaques.

## Abstract

This research aims to examine the potential of various strains of *Staphylococcus* and *Entérobactéries* to form a biofilm, using various tests, and to analyze the effect of incubation time and changes in the culture medium on this formation. We began our study with an analysis of mucoviscosity, revealing diversity in the potential of the strains. *Citrobacter freundii* stood out due to its intense production of mucous substance, indicating a strong ability for adhesion and biofilm formation, whereas *Salmonella* showed lower potential. Subsequently, we conducted the Congo Red Agar (CRA) test, and the results turned out negative, as we observed no change in colony color to indicate biofilm formation. Next, we used the microplate test to quantify the biofilm, and we observed fluctuations in production depending on the incubation duration; after 24 hours of incubation, the results ranged from low to medium and occasionally high, then tended to increase further after 72 hours for certain strains. However, daily renewal of the environment over a three-day period resulted in the absence of biofilm formation for all strains. This information indicates that incubation time promotes biofilm development, whereas regular renewal of the environment hinders its formation.

**Keywords:** *Staphylococcus*, *Entérobactéries*, biofilm, muco-viscosity, *Citrobacter freundii*, *Salmonella*, Congo Red Agar (CRA) test, microplate test .