

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret–
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

M^{lle} CHEKKALI Kheira Khadidja

M^{lle} CHAIMA Imene

M^{lle} MESTOUR Hayet

Thème

**Évaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre
Staphylococcus aureus et d'autres espèces microbiennes**

Soutenu publiquement le : 02/07/2024

Jury:

Grade

Président: M. YEZLI Wassim

MCA

Encadrant: M. MEKHLLOUFI Omar Amine

MAB

Co-encadrant: M^{lle} BENMESSAOUD Amel

Doctorante

Examineur: M^{lle} BOUHENNI Hasna

MAB

Année universitaire 2023-2024

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail et a permis que nous soyons ce que nous sommes aujourd'hui.

Nous adressons nos sincères remerciements à **Dr MEKHLOUFI Omar Amine** et **Mlle BENMESSAOUD Amel**, pour avoir acceptée d'encadrer ce travail et pour leurs conseils et précieuses orientations, leurs patientes qu'ils n'ont cessé de nous apporter tout au long de ce travail.

Nous tenons tout particulièrement à remercier vivement les membres de jury **Dr YEZLI Wassim** et **Dr BOUHENNI Hasna** d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail et de l'enrichir par leurs propositions

Nous remercions chaleureusement toute l'équipe de laboratoire pour leurs disponibilités, pour leur gentillesse.

Nous remercions toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma chère mère, en témoignage de mon éternelle reconnaissance, que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.

A mon cher père, pour son aide et soutien et son patience, cette aventure n'aurait certainement pas existé sans vous.

A mes frères Boucif, Islam, Abdalilah et Mohamed, qui je le sais, ma réussite est très importante à leurs yeux. Que Dieu vous garde pour moi.

A mon adorable petite sœur Tasnim qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A mes amies Hayat et Khadija je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Pour finir, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment, je dédie ce mémoire.

Imene

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

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

A La personne la plus chère à mon cœur : Maman La source de tendresse et la lumière qui guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite, pour tous ses sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie et qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie ..., Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as aimé très profondément et tu as été toujours une mère idéale. Tu es la seule qui comprend ma vie.

A mon père que je le remercie énormément pour ses efforts, ses conseils et sa surveillance, je te dois ma réussite mon éducation, ma fierté. Je te demande pardon et encore une fois Merci.

A mes frères Mehdi et Mustapha, pour l'amour, l'attention et l'aide qu'ils m'ont apportés.

A ma sœur Nadia qui est toujours présente pour moi dans les moments de quiétude et dans les moments difficiles.

A mes chères copines Imene et khadidja qui me sont proche du cœur vous êtes et vous serez toujours comme mes sœurs.

A mes amis et à toutes les personnes qui j'aime...

Enfin, j'offre mes bénédictions à tous ceux qui m'ont soutenu dans l'accomplissement de ce travail.

Hayet

Dédicace

Je dédie ce mémoire à

À ma mère et à mon père, pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants. Vous avez toujours cru en moi, même dans les moments de doute, et vos sacrifices ont été le pilier sur lequel j'ai pu m'appuyer.

À mes 2 frères et ma sœur, pour leur présence réconfortante et leurs encouragements. Votre soutien m'a donné la force de persévérer et d'atteindre mes objectifs.

À mes chères amies, pour leurs encouragements tout au long de ce chemin. Votre présence à mes côtés a rendu ce voyage plus agréable.

Khadîdja Kheira

Résumé

Staphylococcus aureus est un pathogène opportuniste majeur chez l'homme, capable d'échapper au système immunitaire et de causer diverses infections. Il est également connu pour sa capacité à former des biofilms, ce qui rend les infections plus difficiles à traiter.

Cette étude a évalué in vitro la capacité de formation de biofilm de souches de *S. aureus* d'origine animale et alimentaire, ainsi que des biofilms mixtes avec *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et *Candida albicans*, en utilisant trois méthodes: une quantification des biofilm formés sur des microplaques à 96 puits en utilisant le colorant Cristal violet, une quantification des biofilms formés sur des tubes, et une observation au microscope optique. Trente-six souches ont été testées, dont 20 d'origine animale, 8 d'origine alimentaire et 8 souches de référence.

Les résultats ont montré que certaines souches peuvent former des biofilms, avec des capacités variantes de faibles à fortes. Nos analyses indiquent que 27,8 % des souches n'ont pas formé de biofilm, 47,2 % ont montré une faible formation de biofilms, 19,4 % ont formé des biofilms modérés et 5,6 % ont formé des biofilms forts. Les souches de *S. aureus* d'origine animale et alimentaire ont également démontré la capacité de former des biofilms mixtes avec les autres espèces microbiennes, avec des niveaux de production variables. Ces résultats soulignent l'importance de surveiller la formation de biofilm pour gérer les infections causées par ces pathogènes. Et aider à prévenir ou à perturber la formation de biofilm.

Mots clé : *Staphylococcus aureus*, infection polymicrobiennes, biofilm, biofilm mixte

Abstract :

Staphylococcus aureus is a major opportunistic pathogen in humans, capable of evading the immune system and causing various infections. It is also known for its ability to form biofilms, which makes infections more difficult to treat.

This study evaluated in vitro the biofilm-forming capacity of *S. aureus* strains from animal and food origins, as well as mixed biofilms with *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*, using three methods: quantification of biofilms formed on 96-well microplates using Crystal violet staining, quantification of biofilms formed in tubes, and observation under an optical microscope. Thirty-six strains were tested, including 20 of animal origin, 8 of food origin, and 8 reference strains.

The results showed that some strains could form biofilms, with capacities ranging from weak to strong. Our analyses indicate that 27.8% of the strains did not form biofilms, 47.2% showed weak biofilm formation, 19.4% formed moderate biofilms, and 5.6% formed strong biofilms. The *S. aureus* strains from animal and food origins also demonstrated the ability to form mixed biofilms with other microbial species, with varying levels of production. These results highlight the importance of monitoring biofilm formation to manage infections caused by these pathogens and help prevent or disrupt biofilm formation.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, polymicrobial infection, biofilm, mixed biofilm

الملخص:

Staphylococcus aureus هو مُمرض انتهازى رئيسى لدى الإنسان، قادر على الهروب من الجهاز المناعى والتسبب فى مجموعة متنوعة من العدوى. كما أنه معروف بقدرته على تكوين biofilms ، مما يجعل العدوى أكثر صعوبة فى العلاج. قامت هذه الدراسة بتقييم قدرة تكوين biofilm للسلاطات الحيوانية والغذائية من *Staphylococcus aureus* فى المختبر، وكذلك biofilms المختلطة مع *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* والفطريات *Candida albicans* ، باستخدام ثلاث طرق: قياس كمية biofilms المتكونة على ألواح ميكروبلات باستخدام صبغة Cristal violet ، قياس كمية biofilms المتكونة على الأنابيب، والمراقبة بالمجهر الضوئى.

تم اختبار ستة وثلاثين سلالة، منها 20 من أصل حيوانى، 8 من أصل غذائى و 8 سلالات مرجعية. أظهرت النتائج أن جميع السلالات يمكنها تكوين biofilms ، بقدرات متفاوتة من ضعيفة إلى قوية. أشارت تحليلاتنا إلى أن 27.8% من السلالات لم تكون biofilm ، 47.2% أظهرت تكويناً ضعيفاً للـ biofilm ، 19.4% كونت biofilms معتدلة و 5.6% كونت biofilms قوية. كما أظهرت السلالات الحيوانية والغذائية من *S. aureus* قدرة على تكوين biofilms المختلطة مع الأنواع الميكروبية الأخرى، بمستويات إنتاج متفاوتة. تؤكد هذه النتائج على أهمية مراقبة تكوين biofilm لإدارة العدوى التى تسببها هذه المُمرضات، والمساعدة فى منع أو تعطيل تكوين biofilms.

الكلمات المفتاحية: *Staphylococcus aureus* ، العدوى المتعددة الميكروبات، biofilm ، biofilms المختلطة

Table des matières

TABLE DES METIERES	I
LISTE DES TABLEAUX.....	II
LISTE DES FIGURES.....	III
LISTE DES ABREVIATIONS.....	IV
INTRODUCTION.....	1

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1 Objectifs du travail	8
2 Lieu et durée de l'étude	8
3 Matériels utilisés	8
4 Protocole expérimental	8
5 Matériel biologique	10
6 Revivification des souches de <i>S. aureus</i>	10
6.1. Vérification de la pureté des souches.....	10
6.2. Évaluation in vitro de la formation de biofilm.....	11
6.2.1. Évaluation qualitative par méthode de tubes	11
6.2.2. Évaluation quantitative par méthode de Crystal violet.....	11
6.2.1.1. Test du Développement de biofilm.....	11
6.2.1.2. Quantification des biofilms.....	12
6.3. Évaluation de la formation de biofilms mixte.....	12
6.3.1. Observation microscopique des biofilms	13

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Examen macroscopique des souches de <i>S. aureus</i>	15
2. Examen microscopique des souches de <i>S. aureus</i>	15
3. Evaluation de la formation de biofilm.....	16
3.1. Formation des biofilms sur tubes (TM)	16
3.2. Formation des biofilms sur microplaques.....	17
4. Évaluation de formation de biofilm mixte	20
5. Observation microscopique des biofilms	24
Conclusion.....	27
Références bibliographiques	29
Annexes	37

Liste des tableaux

Tableau 1 : Produits et matériels utilisés.....	8
Tableau 2: Origine de souches microbiennes utilisées dans cette étude.....	10
Tableau 3: Les différentes interactions entre les souches au sein du biofilm mixte	13
Tableau 4 :Nombre et pourcentage des souches formatrices et non formatrices du biofilm.....	16
Tableau 5 : Nombre et pourcentage des souches formatrices et non formatrices de biofilm chez <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Tableau 6: Nombres et pourcentages des souches formatrices et non formatrices de biofilm chez les souches de référence.....	19

Liste des figures

Figure 1: Protocole expérimental	9
Figure 2 : Aspect macroscopique d'une souche de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman	15
Figure 3 : Aspect microscopique des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> après coloration (x100).....	15
Figure 4: Formation des biofilms sur tubes	16
Figure 5: Potentiel de la formation du biofilm par les souches de <i>S.aureus</i> d'origine animale	17
Figure 6: Potentiel de la formation du biofilm par les souches de <i>S.aureus</i> d'origine alimentaire.	18
Figure 7: Potentiel de la formation du biofilm par les souches de références.....	18
Figure 8: Formation de biofilm mixte entre une <i>S.aureus</i> d'origine animale (SAH16) et d'autres souches microbiennes.....	21
Figure 9: Formation de biofilm mixte entre <i>S.aureus</i> d'origine animale (SAH15) et d'autres souches microbiennes.	21
Figure 10: Formation de biofilm mixte entre une <i>S.aureus</i> d'origine alimentaire (SA20) et d'autres souches microbiennes	21
Figure 11 : Observation microscopique de biofilm mixte formé par <i>S.aureus</i> et <i>C. albicans</i>	24
Figure 12 : Observation microscopique de biofilm mixte formé par <i>S.aureus</i> et <i>E. coli</i>	25
Figure 13 : Observation microscopique de biofilm mixte formé par <i>S.aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	25

Liste des Abréviations

DO : Densité Optique.

EDS : L'eau distillée stérile.

TM : Méthode en tube.

PBS : Tompon phosphate saline.

SA : *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire.

SAH : *Staphylococcus aureus* d'origine animale.

H : horse.

UFC : Unité formant des colonies par millimètres.

BHI : Brain heart infusion (bouillon Coeur cerlvele).

BHIB: Brain heart infusion growth.

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Dans le genre des staphylocoques, l'espèce la plus courante est *Staphylococcus aureus*. Les *S. aureus* ont été isolés pour la première fois en 1880 par Alexandre Ogston, à partir d'un pus humain présentant une formation en grappe sous microscope, d'où son nom dérivé de "*staphyle*", signifiant grappe. En 1886, l'allemand Anton J. Rosenbach a officiellement nommé cette bactérie *Staphylococcus aureus*, après l'avoir isolée sur milieu solide en raison de la couleur jaune de ses colonies et de leurs morphologies distinctes (**Grace et Fetsch, 2018**) .

Elle se caractérise par des cocci sphériques d'un diamètre de 0,5 à 1 µm, Gram positif, regroupés en amas ressemblant à des grappes visibles sous microscope optique (**Camille, 2014**). Les cellules de *S. aureus* peuvent être généralement observées isolées ou en paires, non motrices et non sporulées (**Castro et al., 2018**). Bien que la plupart des souches de *S. aureus* soient capsulées, elles peuvent perdre leurs capsules après culture (**Ben Messaoud et Ouchache, 2021**) .

Chez L'Homme, ils se trouvent principalement dans le tractus respiratoire supérieur, notamment dans les fosses nasales, ainsi que sur le cuir chevelu et les mains. Les staphylocoques retrouvent également chez les animaux, dans l'air, l'eau et le sol. Ces bactéries affectent environ 30% de la population adulte en bonne santé (**Abdoukel et al., 2023**).

Les staphylocoques, étant peu exigeants, peuvent être facilement isolés dans des milieux de culture liquides ou solides courants comme les géloses ordinaires ou la gélose au sang, tolérant de larges variations de pH (entre 4,8 et 9,4) et de température de croissance de 10 à 45 °C.). Il peut également se développer dans des milieux très salés, ce qui permet l'utilisation de milieux sélectifs. En gélose profond, la croissance se produit sur toute la hauteur du tube, indiquant un caractère aéro-anaérobie de l'espèce. Son identification en laboratoire repose sur ses caractéristiques métaboliques et physiologiques (**Ploy et al., 2016**) .

S. aureus est un pathogène humain majeur responsable d'infections nosocomiales et épidémiques en milieu hospitalier. Il est le pathogène le plus couramment observé dans les pneumonies nosocomiales, les infections de plaies chirurgicales, les infections de brûlures, les infections liées à des corps étrangers (comme les valves cardiaques, les prothèses de hanche, les agrafes, les pacemakers, etc.) ainsi que dans les infections systémiques, souvent provoquées par l'utilisation de cathéters intra vasculaires ou par la dissémination de la bactérie à partir d'un autre foyer infectieux (**Bisognano, 2001**), des complications systémiques graves

INTRODUCTION

pouvant mettre la vie en danger, à l'image de l'endocardite, de l'ostéomyélite, de la pneumonie, des abcès du cerveau, de la méningite, et de la bactériémie (**Bien et al., 2011**).

La gravité de l'infection par *S. aureus* est liée à l'activité de plusieurs gènes responsables de sa virulence. Initialement, des adhésines présents sur sa surface permettent au micro-organisme de reconnaître et de s'attacher aux structures de l'hôte, ce qui facilite sa colonisation et sa prolifération. Par ailleurs, une variété d'enzymes (telles que l'hyaluronidase, les protéases, et les nucléases), d'activateurs non-enzymatiques (comme la coagulase ou la staphylokinase) et d'exotoxines y compris les toxines cytolytiques, les toxines exfoliatives, les leucocidines, les entérotoxines, les protéines semblables aux entérotoxines, et la toxine-1 du syndrome de choc toxique qui contribuent à l'évasion de la bactérie face à la réponse immunitaire de l'hôte. Il semble que cette expression séquentielle des facteurs de virulence joue un rôle clé dans la pathogénèse de la mastite causée par *S. aureus* (**da Silva et al., 2024**).

Les éléments qui déterminent la virulence de *S. aureus* sont encodés dans son génome accessoire, le génome principal est dédié essentiellement aux fonctions basiques de maintien. Les éléments génétiques mobiles (EGM) tels que les plasmides, les transposons, les séquences d'insertion, les prophages et les îlots de pathogénicité se trouvent dans le génome accessoire. Ces éléments portent non seulement les facteurs de virulence mais incluent aussi les gènes responsables de la résistance aux antibiotiques (**Cheung et al., 2021**).

Parmi les facteurs de virulence responsables de la pathogénicité de *S. aureus* sa capacité à former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (**Achek et al., 2020**).

Les staphylocoques possèdent la capacité de former des « biofilms » qui adhèrent à une grande variété de surfaces, ce qui a des répercussions directes sur les maladies humaines. Actuellement, on estime qu'environ 70 % des infections chroniques chez les animaux et les humains sont associées à la formation de biofilms (**Bergon, 2016**).

Les biofilms sont des agrégats microbiens fixés, où les cellules adhèrent à un substrat ou à d'autres cellules, et sont enveloppées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires qu'elles sécrètent, ce qui leur confère un phénotype distinct des cellules planctoniques (**Brackman et Coenye, 2015**).

En 1923, Angst a estimé que près de 80 % de la biomasse microbienne de la planète existe sous forme de biofilm. Ce mode de vie permet aux bactéries de survivre dans des environnements hostiles grâce, entre autres, à une plus grande résistance ou tolérance aux

INTRODUCTION

antibiotiques, aux désinfectants, ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte, comparé aux bactéries libres ou planctoniques. Les bactéries capables de former des biofilms peuvent causer des problèmes cliniques chez l'homme et l'animal. Les National Institutes of Health (NIH) aux États-Unis estiment que plus de 75 % des infections microbiennes chez l'homme (par exemple, endocardite, septicémies, infections associées aux soins) sont dues à la persistance des bactéries sous forme de biofilm (**Goetz et al., 2016**).

La formation de biofilm sur n'importe quelle surface implique principalement 3 étapes. La première étape concerne l'adhésion des cellules à une surface suivie de l'assemblage des cellules pour former des microcolonies et enfin la différenciation du biofilm en une structure mature. Après le développement complet du biofilm, son démantèlement ou sa dispersion se produit à travers des processus à la fois mécaniques et actifs (**Roy et al., 2018**).

La formation de biofilms est un processus complexe qui dépend de plusieurs facteurs comme les nutriments disponibilité, valeur du pH, niveau d'oxygène et propriétés de surface (**Otto, 2018**). De plus, la formation de biofilms dans *S. aureus* est sous le contrôle de deux locus génétiques, *sarA* (régulateur accessoire staphylococcique) et *agr* (régulateur de gène accessoire) système de quorum sensing (**Shenkman et al., 2001**) (**Zhang et al., 2018**).

Le système de quorum sensing (QS) se distingue comme l'un des principaux régulateurs du développement des biofilms. Chez les souches de *S. aureus*, le système QS joue un rôle clé dans la transition de la formation du biofilm à son démantèlement et est un procédé de signalisation entre cellules, facilitant l'échange d'informations parmi les bactéries selon leur concentration cellulaire (**Mukherjee et Bassler, 2019**) (**Tuon et al., 2023**).

La dernière décennie a vu une reconnaissance accrue du fait que les biofilms de *S. aureus* constituent une préoccupation majeure dans de multiples infections, y compris les infections associées aux implants et les plaies chroniques, l'ostéomyélite, l'infection pulmonaire liée à la fibrose kystique et l'endocardite. (**Kiedrowski et Horswill, 2011**) En conséquence, la recherche sur le développement des biofilms de *S. aureus* a contribué à une meilleure compréhension de la complexité de la pathogenèse de *S. aureus* et à des progrès significatifs dans le développement de thérapies contre les infections par biofilms. Bien que nombre d'entre elles soient prometteuses, aucun traitement efficace unique n'est actuellement disponible pour les patients souffrant d'infections par biofilms de *S. aureus* (**Otto, 2010**) (**McConoughey et al., 2014**).

Une inquiétude importante concernant les infections par biofilm de *S. aureus* réside dans la rapide augmentation de l'utilisation des implants médicaux et des prothèses,

INTRODUCTION

accompagnée d'une hausse des infections liées à ces dispositifs (McConoughey *et al.*, 2014) (Ribeiro *et al.*, 2012). *S. aureus* est fréquemment trouvé sur des surfaces artificielles telles que les implants orthopédiques, les valves cardiaques, les stimulateurs cardiaques et les cathéters vasculaires (Bereket *et al.*, 2012) (Otto, 2013).

De plus, Il est démontré que les microbes, lorsqu'ils se trouvent dans un biofilm, peuvent augmenter leur résistance face aux antimicrobiens de 10 à 1000 fois (Kulshrestha et Gupta, 2023).

S. aureus fait partie des bactéries ayant développé une résistance à divers antibiotiques, ce qui en fait un pathogène difficile à traiter. Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) et à la vancomycine (VRSA) sont les types les plus fréquents de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques. *S. aureus* a rapidement développé une résistance à plusieurs antibiotiques, représentant un défi majeur dans le traitement des infections qu'il cause chez l'homme. De plus, *S. aureus* produit des enzymes qui neutralisent les antibiotiques, menant à une variété de mécanismes de résistance face aux médicaments thérapeutiques (Tuon *et al.*, 2023) de plus, les résultats des tests de sensibilité traditionnels réalisés sur des espèces bactériennes isolées en culture planctonique, ne correspondent souvent pas aux résultats cliniques. Il est de plus en plus reconnu que de nombreuses infections, comme les infections pulmonaires chez les patients atteints de fibrose kystique (FK), sont de nature polymicrobienne et se caractérisent par la croissance d'organismes au sein de communautés appelées biofilms (Beaudoin *et al.*, 2017).

Les biofilms mixte constituent un environnement complexe dans lequel les micro-organismes co-infectés peuvent interagir de manière antagoniste, additive ou synergique pour modifier l'issue de la maladie par rapport aux infections mono-microbiennes. L'interaction dans les biofilms polymicrobiens influence la fonction physiologique du biofilm en augmentant la résistance, la virulence ou la dégradation des polluants, ce qui peut fortement affecter la santé humaine, les interactions polymicrobiennes les plus étudiées et les plus diverses proviennent de la cavité buccale (Mariani et Galvan, 2023).

Les interactions fongiques-bactériennes se produisent par co-agrégation et adhésion. Des molécules d'adhésion, telles que les adhésines liées aux hyphes fongiques et celles trouvées sur la surface des cellules bactériennes facilitent les interactions (Anju *et al.*, 2022)

INTRODUCTION

Les infections polymicrobiennes associées aux biofilms sont souvent difficiles à traiter. *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* figurent parmi les principaux agents pathogènes en raison de leur capacité à former des biofilms sur les dispositifs médicaux (Vila *et al.*, 2021).

S. aureus et *C. albicans* ont été trouvés formant des biofilms persistants sur des surfaces abiotiques ou chez un hôte. L'interaction entre ces biofilms est un précurseur d'une tolérance accrue aux médicaments, d'une évasion immunitaire et d'une virulence accrue, ce qui entraîne une augmentation de la mortalité (Todd et Peters, 2019). *S. aureus* favorise la croissance fongique et la transition hyphale de *C. albicans* par des contacts cellule à cellule. (Bose *et al.*, 2023)

D'autre part, *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif) étant tous deux nosocomiaux, peuvent former un biofilm mixte (Deng *et al.*, 2024). Selon différentes études, *S. aureus* et *P. aeruginosa* s'influencent mutuellement en régulant des gènes qui contrôlent des voies métaboliques essentielles dans les deux espèces bactériennes. Par exemple, dans des modèles de co-infection, *P. aeruginosa* modifie la biosynthèse de la paroi cellulaire de *S. aureus*, augmentant ainsi son épaisseur et provoquant une résistance intermédiaire à la vancomycine. (Dehbashi *et al.*, 2024)

La relation entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* est de nature compétitive, bien que les deux organismes soient fréquemment trouvés ensemble dans les environnements cliniques. Ils ont des niches communes au sein de l'hôte, comme dans les poumons des personnes souffrant de fibrose kystique, le péritoine des patients sous dialyse, à l'intérieur de cathéters, les plaies du pied diabétique et d'autres types de plaies causées par des lésions ou des brûlures cutanées. Il est couramment observé que *S. aureus* est le premier agent infectieux détecté dans les poumons des patients avec fibrose kystique, *P. aeruginosa* venant ensuite dans la hiérarchie des pathogènes (Nair *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail a porté principalement sur :

L'étude de la capacité de formation de biofilm chez les souches de *Staphylococcus aureus* d'origine animale et alimentaire.

- L'étude de la capacité de formation de biofilm mixte entre *Staphylococcus aureus* et les espèces microbiennes.
- Mettre on point la technique de coloration au crystal violet pour quantifier et classer les biofilms selon leur densité.

INTRODUCTION

- Observation microscopique des biofilms mixte.

Chapitre I

Matériel et Méthodes



1 Objectifs du travail

Notre étude a pour but d'évaluer in vitro la capacité des souches de *Staphylococcus aureus* d'origine alimentaire et animale à former des biofilms. De plus, nous cherchons à déterminer leur capacité à créer des biofilms mixtes en interaction avec d'autres espèces microbiennes.

2 Lieu et durée de l'étude

La démarche expérimentale de notre étude a été menée au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret, sur une période allant du 6 février 2024 au 21 mars 2024.

3 Matériels utilisés

Le matériel, les verreries, les milieux de culture et les réactifs utilisés dans la partie expérimentale sont illustrés dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1 : Produits et matériels utilisés.

Matériel et appareillage	Verreries et autre	Milieux de culture	Réactifs et colorants
Agitateur magnétique thermique	Boîtes de Pétri	Gélose Sabouraud	Méthanol (96%)
Autoclave (sano clav)	Tubes à essai	Gélose nutritive	Ethanol (96%)
Microplaques à 96 puits	Anse de platine	Gélose king A	Violet de Gentiane
Micropipettes	Les Lames d'acier inoxydable	BHIA gélose (Brain Heart infusion agar)	Bleu de méthylène
Balance électrique	Béchers	Bouillon cœur cervelle	Alcool
Spectrophotomètre UV-visible (Jenway 7305)	Embouts	Sabouraud Bouillon	Crystal violet
Spectrophotomètre lecteur de microplaque	Flacons en verre		

4 Protocol expérimental

L'approche expérimentale est illustrée dans la figure 1

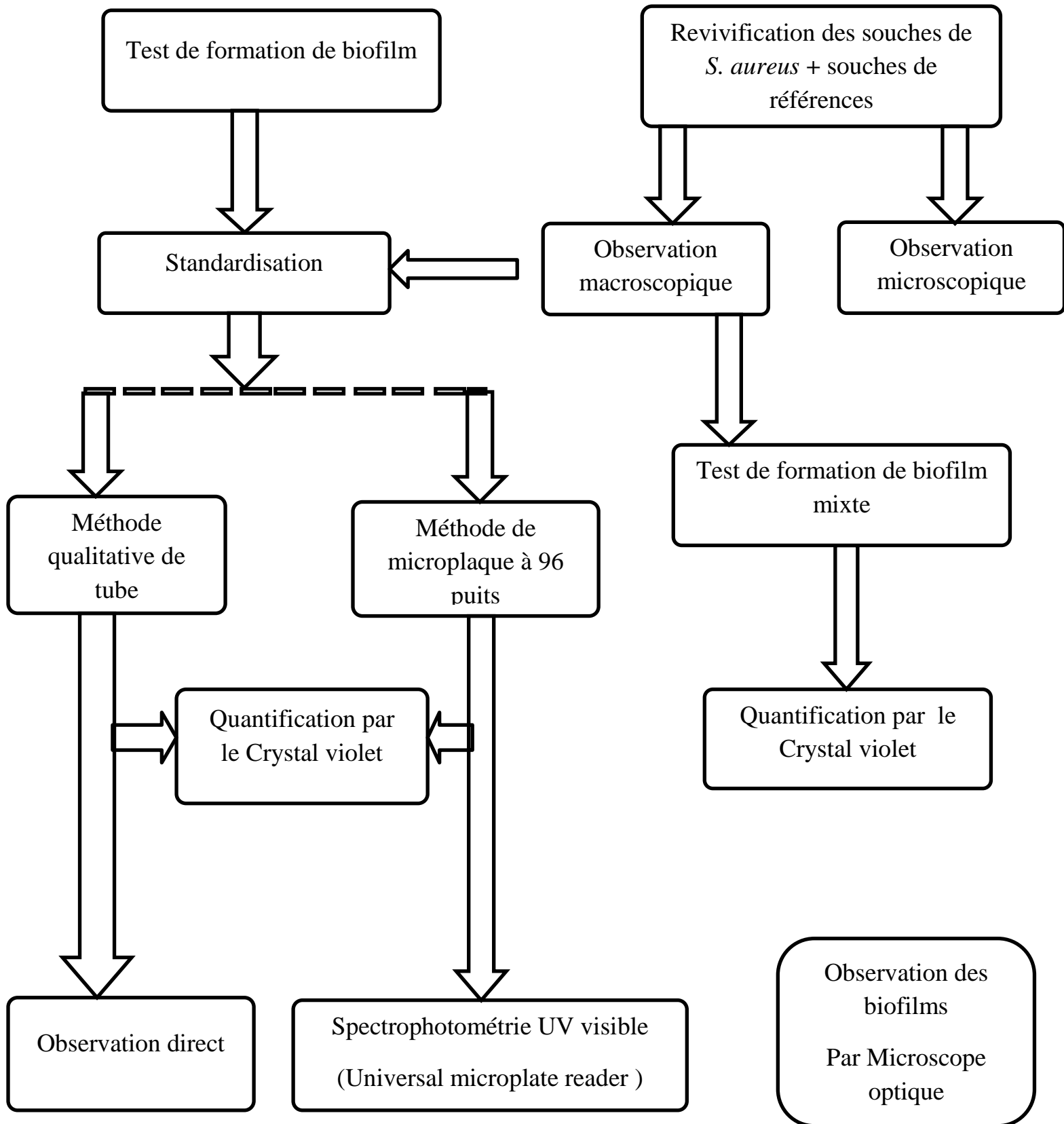


Figure 1: Protocole expérimental.

5 Matériel biologique

Au cours de cette étude, 28 souches de *S. aureus* ont été analysées. L'origine de ces souches isolées est indiquée dans le tableau ci-dessous. 20 de ces souches, d'origine animale, ont été isolées à partir du portage nasal des chevaux et 8 souches d'origine alimentaire ont été isolées à partir des aliments prêts à manger (Mekhloufi *et al.*, 2021) (Tableau 2).

Tableau 2: Origine de souches microbiennes utilisées dans cette étude.

Souche	Origine	Code
<i>S. aureus</i>	D'origine animale	SAH, SAH 01, SAH 02, SAH 03, SAH 04, SAH 06, SAH 09, SAH 10, SAH 11, SAH 12, SAH 13, SAH 14, SAH 15, SAH 16, SAH 17, SAH 18, SA H19, SAH 20, SAH 21.
	D'origine alimentaire	SA 02, SA 04, SA 08, SA 10, SA 18, SA 20, SA 46, SA 51.
	De références	DSM (20231) SA (ATCC 43300) SN (ATCC 6538)
Souches microbiennes	<i>E. coli</i>	EA (ATCC 8736) EN (ATCC 25922)
	<i>P. aeruginosa</i>	PA01 \ PA (ATCC 9027)
	<i>C. albicans</i>	CA (ATCC 10231), M3 (ATCC 10237).

6 Revivification des souches de *S. aureus*

Les souches testées ont été conservés à une température de -20 °C. Une revivification a été réalisée par un enrichissement dans du bouillon cœur-cerveille pendant 24 h à 37 °C pour les souches de staphylocoques ainsi que les souches de référence. Ensuite, elles ont été repiquées successivement sur gélose Chapman et BHIA et incubées à 37 °C pendant 24 h.

6.1.Vérification de la pureté des souches

Toutes les souches ont été repiquées sur des milieux sélectifs suivis d'un examen macroscopique, permettant de caractériser la morphologie, la couleur, la texture et la consistance des colonies de bactéries. Ensuite, une observation microscopique a été réalisée

après une coloration de Gram, permettant d'examiner les caractéristiques fines des bactéries au niveau cellulaire.

6.2.Évaluation in vitro de la formation de biofilm

6.2.1. Évaluation qualitative par méthode de tubes

La méthode des tubes est une technique qualitative utilisée pour détecter les biofilms. Les souches ont été d'abord inoculées dans 10 ml de bouillon BHI dans des tubes à essai, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Après l'incubation, le bouillon a été soigneusement vidé, et les tubes ont été nettoyés avec de l'eau distillée stérile et laissés à sécher. Ensuite, une coloration au cristal violet à 0,1 % a été réalisée. L'excès de colorant non fixé a été éliminé par lavage à l'eau distillée stérile, puis les tubes ont été séchés en position inversée (El Naghy *et al.*, 2020). L'évaluation de la formation de biofilms est basée sur les résultats obtenus avec des souches de contrôle, la présence d'un film épais visible sur les parois et le fond du tube est défini comme un indicateur positif de biofilm (Rewatkar *et Wadher*, 2013).

6.2.2. Évaluation quantitative par méthode de Crystal violet

La formation des biofilms a été réalisée sur des microplaques à 96 puis selon le protocole apporté par (O'Toole, 2011). Le principe de cette méthode repose sur la capacité des espèces microbiennes à se fixer aux parois des puits de la plaque, cependant la présence d'un biofilm sera détectée par une coloration au crystal violet (Alain *et al.*, 2003).

6.2.1.1. Test du Développement de biofilm

À partir d'une culture jeune de 18 h, quelques colonies individuelles ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine et placées dans des tubes contenant 9 ml de milieu de culture (Bouillon BHI pour les bactéries et milieu Sabouraud liquide pour les *C. albicans*). Un vortex a été utilisé pour assurer une homogénéité du mélange, puis la densité optique de chaque suspension a été ajustée entre 0,08 et 0,14 pour les bactéries et entre 0.14 et 0.20 pour les levures, mesurées à une longueur d'onde de 625 nm, équivalent d'une charge microbienne de 10^6 UFC/ml. Ensuite, 200 µL de suspensions microbiennes standardisées de chaque souche ont été déposés dans les puits d'une microplaque. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche, tandis que 200 µL de milieu BHI liquide et sabouraud ont été ajoutés pour le contrôle négatif. Les microplaques ont ensuite été recouvertes et incubées pendant 48 h à 37 °C.

6.2.1.2. Quantification des biofilms

Après l'incubation, les cellules non adhérentes ont été éliminées par trois lavages des puits de la plaque avec du tampon phosphate saline (PBS). Ensuite, 200 μ L de solution de cristal violet ont été ajoutés dans chaque puits et laissés à incuber pendant 20 min à température ambiante. Par la suite, les puits ont été rincés quatre fois avec du PBS dans un bac approprié, puis le liquide a été vigoureusement secoué au-dessus du bac. Les plaques ont été ensuite inversées et laissées à sécher sur du papier absorbant. Après séchage, 200 μ L de méthanol à 96 % ont été ajoutés dans chaque puits pour solubiliser le cristal violet fixé aux biofilms. Les plaques ont été recouvertes et laissées à incuber pendant 15 min à température ambiante (O'Toole, 2011).

La quantification de l'absorbance a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, lecteur de microplaques, à une longueur d'onde de 660 nm. Les souches ont été classées selon les critères de (Stepanović *et al.*, 2000) sur la base de valeurs seuils établies (DOc) :

- Non productrice de biofilm (-) $DO \leq DOc$
- Faible production de biofilm (+) $DO c < DO \leq 2x DOc$
- Production modéré de biofilm (++) $2x DOc < DO \leq 4x Doc$
- Forte production de biofilm (+++) $4x DOc < DO$

Où : DOc = DO moyenne du contrôle négatif + (3 x l'écart type du contrôle négatif).

6.3. Évaluation de la formation de biofilms mixte

Dans cette partie, la capacité des souches de *S. aureus* à former un biofilm mixte avec différentes espèces microbiennes a été évaluée. Les souches présentant un biofilm modéré à intense ont été choisies pour ce test.

Technique

Chaque suspension microbienne a été préparée à partir de cultures de 18 h, ajustées à une concentration de 10^6 UFC/ml. L'interaction entre *S. aureus* et *E. coli* a été testée en ajoutant 100 μ L de la suspension standardisée de chaque souche dans les puits de la microplaque. Le même protocole a été suivi pour les interactions entre *S. aureus* et *C. albicans*, ainsi que *P. aeruginosa*. Pour chaque interaction le test est répété 3 fois. Le tableau 3 représente les différentes interactions entre les souches. Pour le contrôle négatif, 100 μ L de bouillon BHI ont été ajoutés. La microplaque a ensuite été recouverte et incubée pendant 48 h à 37 °C.

Tableau 3: Les différentes interactions entre les souches au sein du biofilm mixte.

Association des souches			
SAH15 + M3	SAH15 + PAO1	SAH15 + EA	SAH15 + DSM
SAH16 + M3	SAH16 + PAO1	H16 + EA	SAH16 + DSM
SA20 + M3	SA20 + PAO1	SA20 + EA	SA20 + DSM

6.3.1. Observation microscopique des biofilms

Des microplaques à 12 puits ont été utilisées pour ce test. Des lames en verre stériles de 1 cm ont été déposées dans chaque puits, puis 500 μ L de la suspension de *S. aureus*, seule ou en combinaison, ont été ajoutés et incubés pendant 24 heures à 37 °C. Les puits ont ensuite été lavés avec du PBS, suivis par une étape de fixation des biofilms en ajoutant 500 μ L de glutaraldéhyde à 2 % pendant 20 minutes à température ambiante. Après cette fixation, les puits ont été lavés avec du PBS avant d'être progressivement déshydratés à l'aide de solutions d'éthanol à 20 %, 40 %, 60 %, 80 % et 100 % pendant 15 minutes chacune. Les biofilms ont été séchés à l'air libre et examinés à l'aide d'un microscope optique (**Makovcova et al., 2017; Benziane et al., 2023**).

Chapitre II

Résultats et discussion



1. Examen macroscopique des souches de *S. aureus*

Après une incubation de 24 h sur le milieu Chapman, l'observation à l'œil nu a révélé que la plupart des souches isolées présentaient des colonies jaune crémeuses, toutes ayant une texture lisse similaire.



Figure 2 : Aspect macroscopique d'une souche de *S. aureus* sur milieu Chapman.

2. Examen microscopique des souches de *S. aureus*

Après la coloration de Gram et l'examen au microscope avec des objectifs ($\times 40$) puis ($\times 100$) à immersion dans l'huile, l'observation microscopique a révélé des résultats similaires pour toutes les souches : des cocci Gram positifs, de tailles uniformes.

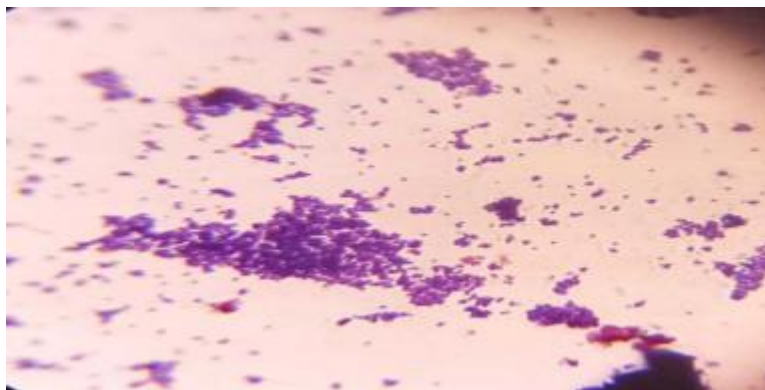


Figure 3: Aspect microscopique d'une souche de *S. aureus* après coloration ($\times 100$).

3. Evaluation de la formation de biofilm

Dans cette étude, 36 souches ont été isolées à partir d'échantillons. La capacité de ces souches à produire des biofilms a été évaluée à l'aide de méthodes classiques de détection *in vitro*, notamment la méthode quantitative sur microplaque à 96 puits en mesurant la biomasse des biofilms formés, la méthode qualitative des tubes (TM) et l'observation microscopique des biofilms.

3.1. Formation des biofilms sur tubes (TM)

Le tableau 4 et la figure 4 représente les résultats du test de formation des biofilms sur tubes. La présence d'un biofilm est confirmée par un voile qui tapisse à la fois les parois et le fond du tube. Les résultats ont démontré que sur 28 souches, 5 souches ont montré une capacité à former du biofilm (18%), tandis que 23 souches n'ont pas été capables de former du biofilm (82%) en comparant avec la souche standard (PAO1) qui représente un biofilm intense (Cheng *et al.*, 2022).

Tableau 4: Nombre et pourcentage des souches formatrices et non formatrices du biofilm.

Formation de biofilm	Non formatrice	Formatrice
Souches no. (%)	23 (82%).	5 (18%)

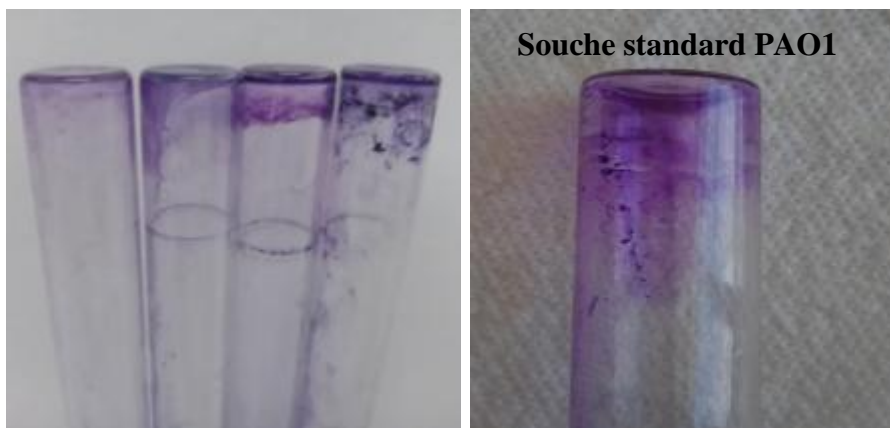


Figure 4: Formation des biofilms sur tubes

Nos résultats indiquent que seulement 18 % des souches ont montré une capacité à former des biofilms, tandis que 82 % des souches étaient non formatrices de biofilm. Des résultats différents ont été obtenus par **Afreenish *et al.*, (2011)** et **Melo *et al.*, (2013)**, qui ont observé que près de la moitié (49 %) des souches de *S. aureus* isolées étaient classées comme productrices de biofilm, tandis que 51 % étaient non productrices de biofilm. Il était difficile de différencier les producteurs modérés et faibles de biofilm en raison de la variabilité des résultats détectés par les différents observateurs. Conformément aux études précédentes, la méthode des tubes (MT) ne peut être suggérée comme test de dépistage général pour identifier les isolats producteurs de biofilms (**Hassan *et al.*, 2011**).

3.2. Formation des biofilms sur microplaques

L'évaluation de la formation de biofilm a été réalisée par la méthode de coloration au cristal violet dans des microplaques à 96 puits. Les densités optiques (DO) mesurées par le lecteur de microplaques à absorbance des souches de *S. aureus* isolées ainsi que les souches de référence sont présentées dans les figures 5, 6 et 7.

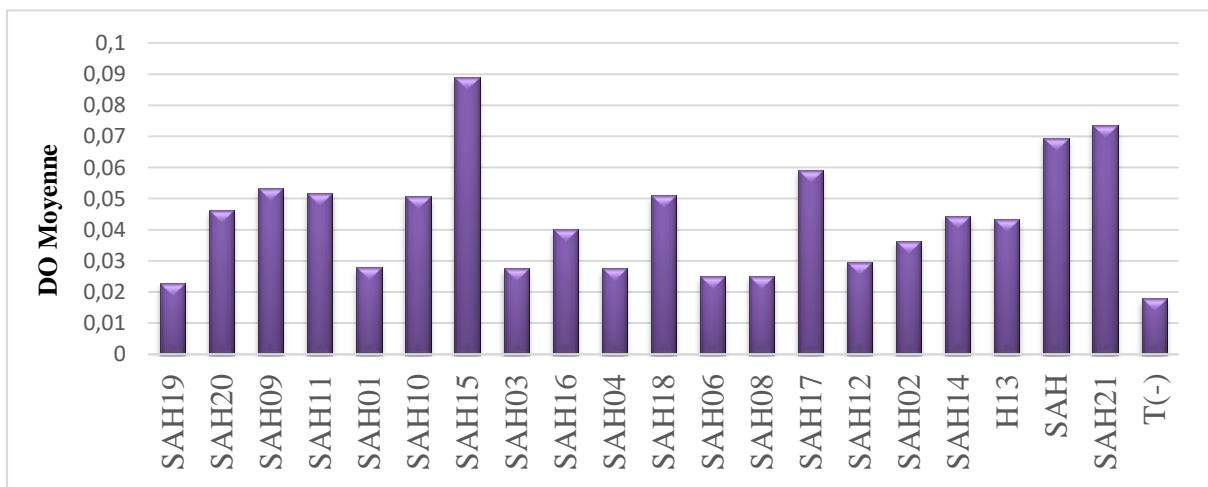


Figure 5: Potentiel de la formation du biofilm par les souches de *S. aureus* d'origine animale

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

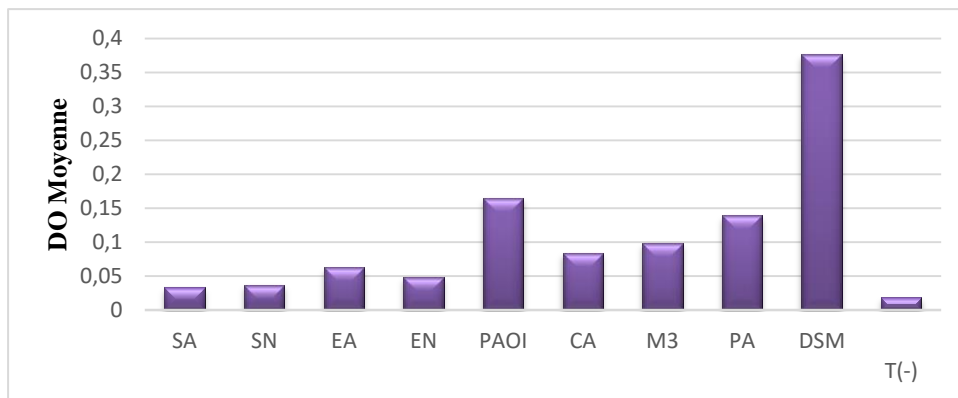


Figure 6: Potentiel de la formation du biofilm par les souches de *S. aureus* d'origine alimentaire.

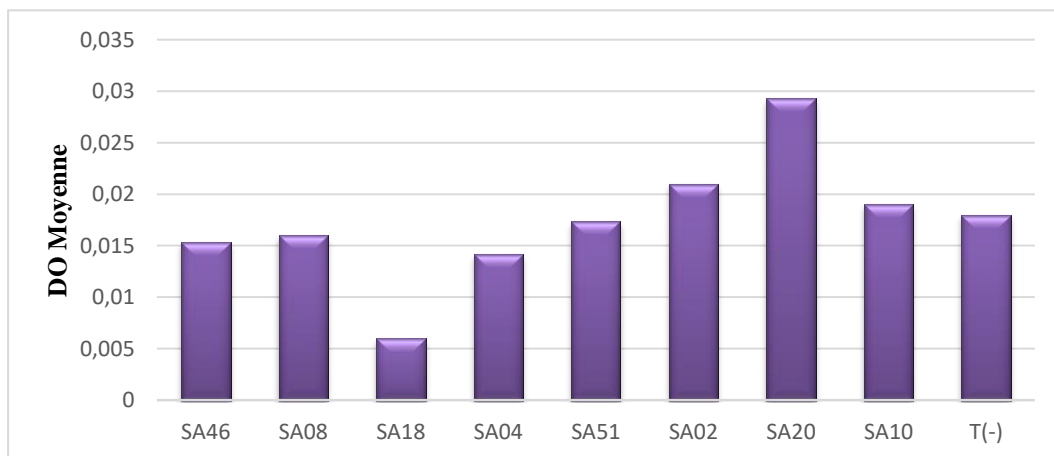


Figure 7: Potentiel de la formation du biofilm par les souches de référence.

L'analyse de la densité optique pour les 36 souches microbiennes, comparée à la DOc, a révélé que 27,8 % des souches ne présentaient pas de biofilms, tandis que 72,2 % avaient la capacité d'en former. Parmi ces dernières, 47,2 % formaient des biofilms faibles, 19,4 % des biofilms modérés et 5,6 % des biofilms intenses (Tableau 5 et Tableau 6)

Tableau 5: Nombre et pourcentage des souches formatrices et non formatrices de biofilm chez *S. aureus*.

Catégories	Souches no.	Pourcentage	DO
Non formation de biofilm	10/28	35.71%	$\geq 0,013$
Formatrice de biofilm	18/28	64.29%	< 0.013
Biofilm faible	14/28	50%	0,027 - 0,054
Biofilm modéré	04/28	14.29%	0,054 - 0,108
Biofilm intense	0/28 ¹⁸	/	$< 0,108$

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 6: Nombres et pourcentages des souches formatrices et non formatrices de biofilm chez les souches de référence.

Catégories	Souches no.	Pourcentage	DO
Non formation de biofilm	0/08	/	/
Formatrice de biofilm	8/08	100%	< 0.013
Biofilm faible	3/08	37,5%	0,027 - 0,054
Biofilm modéré	3/08	37,5%	0,054 - 0,0108
Biofilm intense	2/08	25%	< 0,108

Les bactéries et de nombreux types de champignons sont capables de croître soit en tant que cellules isolées en suspension (croissance planctonique), soit en s'assemblant en des agrégats multicellulaires connus sous le nom de biofilms (**Yi Jey Lin et al., 2017**).

S. aureus est l'une des bactéries qui peuvent former des biofilms dans des environnements naturels et cliniques, à la fois sur des surfaces biotiques et abiotiques.

Dans notre étude, 64 % des souches de staphylocoques, toutes origines confondues, ont formé des biofilms selon la méthode de microplaque. En comparaison, **Mélo et al. (2012)** ont trouvé que 93 souches sur 94 (98,9 %) étaient productrices de biofilms avec cette même méthode. Une étude algérienne menée par (**Bouziane et Hachour, 2021**) a révélé que toutes les souches, indépendamment de leur origine, peuvent former des biofilms, bien que leur capacité varie. Plus de la moitié (59,89 %) des souches étaient fortement formatrices de biofilms, tandis que les autres montraient une formation modérée ou faible de biofilms. Similaires résultats ont été obtenus par **Gajewska et Chajęcka-Wierzchowska (2020)**.

D'après une étude menée par **Boukera Abbaci et Dawdi (2019)**, 100 % des isolats alimentaires étaient formateurs de biofilm, contrairement à nos résultats où seulement une souche sur neuf a formé un biofilm. Concernant les souches d'origine animale, 85 % étaient formatrices de biofilm. **Kara Terki (2014)** a rapporté que 40,5 % des souches de *S. aureus* étaient formatrices de biofilm, avec seulement deux souches étaient classées comme fortement productrices de biofilm, tandis que 58 souches étaient modérément productrices.

Nos résultats concordent avec les observations d'autres auteurs, qui montrent que peu de souches sont formatrices de biofilm dans un milieu de croissance sans supplément (sucre, antibiotiques, NaCl, etc.). **Johannes et al. (2002)** ont montré que, dans un milieu de base,

seulement 4 souches sur 128 de *S. aureus* isolées formaient un biofilm. De même, **Mathur et al., (2006)** ont trouvé que, dans les mêmes conditions, 7 souches sur 152 étaient formatrices de biofilm. En comparant les souches isolées des souches de références, parmi ces dernières deux ont présenté une formation modérée des biofilms et une a formé un biofilm intense (DMS).

La technique de microplaque est considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm. Cette méthode est rapportée comme étant précise et reproductible pour la détermination de la formation de biofilm chez les staphylocoques (**Kara, 2014**).

Dans notre étude, les deux souches de référence de *C. albicans* ont montré une formation de biofilm modérée. Cette levure pathogène opportuniste forme des biofilms sur diverses surfaces. Ces biofilms, entourés d'une matrice d'exopolymères, augmentent la résistance de *C. albicans* aux traitements antifongiques et aident la levure à échapper au système immunitaire (**Pereira et al., 2021 ; Atriwal et al., 2021**).

E. coli est une bactérie largement étudiée, reconnue pour sa capacité à former des biofilms (**Wang et al., 2004**). Dans notre étude, nous avons examiné deux souches de référence d'*E. coli* capable de former des biofilms. L'une de ces souches a été classée comme modérément formatrice de biofilm, tandis que l'autre a été considérée comme faiblement formatrice de biofilm. De même, deux souches de *Pseudomonas* avec des biofilms intenses ont été étudiées.

4. Évaluation de formation de biofilm mixte

Dans notre étude, nous avons évalué la formation de biofilm mixte de trois souches de *S. aureus* choisis en raison de leurs formations d'un biofilm modéré avec les espèces microbiennes suivantes : *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Les résultats des moyennes de densités optiques après mesure avec le spectrophotomètre pour microplaques de toutes les souches étudiées individuelles ou en associations, sont illustrés dans les figures 8, 9 et 10.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

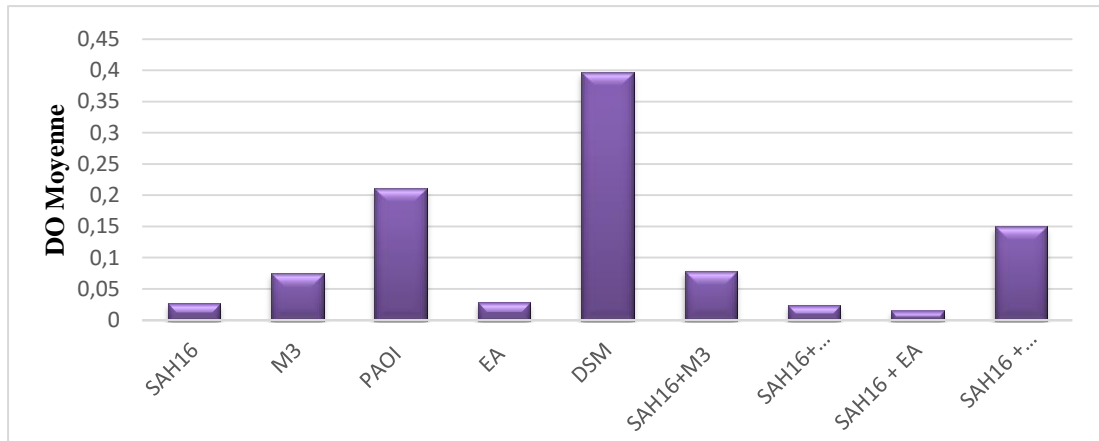


Figure 8: Formation de biofilm mixte entre une *S. aureus* d'origine animale (SAH16) et d'autres souches microbiennes.

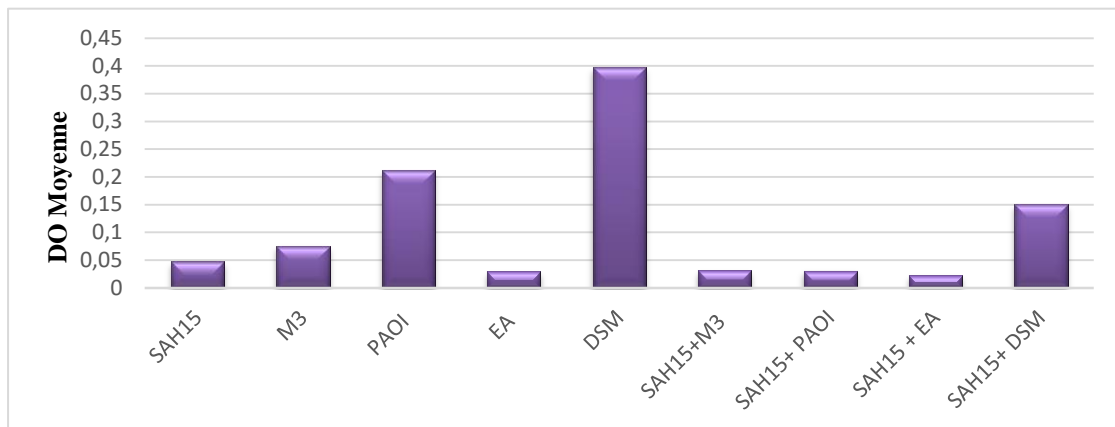


Figure 9: Formation de biofilm mixte entre *S. aureus* d'origine animale (SAH15) et d'autres souches microbiennes.

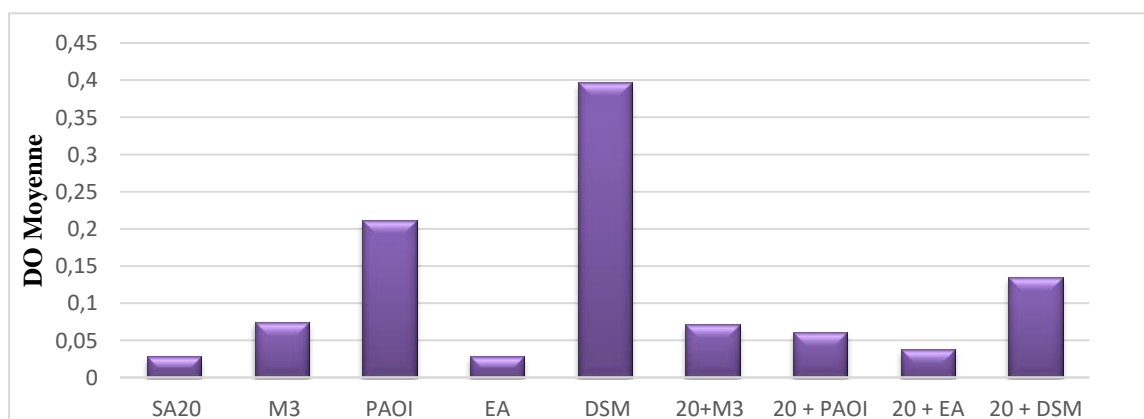


Figure 10: formation de biofilm mixte entre une *S. aureus* d'origine alimentaire (SA20) et d'autres souches microbiennes.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus indiquent que la densité optique (DO) des biofilms à deux espèces, formés par la souche de *S. aureus* (H15) en combinaison avec diverses espèces microbiennes *C. albicans* (M3 ATCC 10237), *P. aeruginosa* (PAO1) et *S. aureus* (DSM 20231), est généralement inférieure par rapport aux biofilms monocultures, tandis que l'interaction entre la souche de *S. aureus* (H15) et la souche *E. coli* (EA ATCC 8736) n'a pas formé de biofilm mixte. Cela suggère que la co-culture de *S. aureus* H15 avec ces espèces réduit l'accumulation de biomasse ou la densité des biofilms. Cependant, la souche d'origine animale *S. aureus* (H16) ne forme pas de biofilms mixtes avec *P. aeruginosa* ou *E. coli*. Dans ces cas, la densité optique des biofilms mixtes est inférieure à celle des biofilms monocultures, indiquant un manque de synergie ou même une inhibition mutuelle dans la formation de biofilms mixtes.

En revanche, lorsque la souche animale de *S. aureus* (H16) est co-cultivée avec *C. albicans*, la DO moyenne est significativement supérieur à celle des biofilms monocultures (modérément formatrices de biofilms). Cela indique que l'interaction entre ces deux espèces favorise une accumulation accrue de biofilm.

Nos résultats montrent également que la densité optique moyenne (DO) des biofilms composés de deux espèces, formés par la souche alimentaire de *S. aureus* (SA20) avec *C. albicans* (M3), *P. aeruginosa* (PAO1), et *S. aureus* (DSM), était légèrement diminuées par rapport aux biofilms mono-spécifiques. Cependant, lorsque *S. aureus* (SA20) est co-cultivé avec *E. coli* (EA), les résultats montrent des valeurs de DO supérieures à celles des biofilms monoculture (Formation de Biofilm modéré).

Par ailleurs, nos résultats ont montré que le biofilm de *P. aeruginosa* (PAO1) présentait une densité optique intense (DO = 0,211). Cependant, en interaction avec les trois souches de *S. aureus*, la DO moyenne était significativement inférieure à celle du biofilm de *P. aeruginosa*. Cela laisse supposer que la présence de *S. aureus* a affecté la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*.

Les résultats du test au cristal violet montrent que *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* et *P. aeruginosa* ont tous la capacité de former des biofilms mono-espèces. Cependant, lorsqu'ils sont cultivés en biofilms à deux espèces, on observe généralement une diminution du volume total de biomasse par rapport aux biofilms mono-espèces. La seule exception notable à cette observation concerne la co-culture de *S. aureus* (SA20) et *E. coli*, qui ne présente pas cette diminution de biomasse et n'a montré aucune formation de biofilm.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Nos résultats sont partiellement cohérents avec l'étude **Makovcova et al., (2017)**. Leur recherche, utilisant une quantification au cristal violet, a montré que *S. aureus* et *E. coli* pouvaient former des biofilms mono-espèces avec des valeurs de densité optique des biofilms mixtes (*S. aureus* et *E. coli*) non significativement différentes de celles des biofilms mono-espèce d'*E. coli*. Cela indique que la co-culture des deux espèces bactériennes n'a pas modifié la formation de biofilms par rapport aux biofilms formés uniquement par *E. coli*.

Une étude antérieure menée par **Millezi et al., (2012)** a révélé que la présence d'*E. coli* dans un biofilm mixte avec *S. aureus* entraîne une diminution du nombre de cellules viables de *S. aureus*. (**Pompermayer & Gaylarde, 2000**) ont également constaté une compétition entre ces deux espèces lors de leur adhésion, suggérant que l'adhésion d'*E. coli* pourrait être favorisée par son temps de génération plus court, lui permettant de dominer plus facilement.

Dans une autre étude, (**Valle et al., 2006**) ont montré que les capsules d'*E. coli* du groupe II sécrètent un polysaccharide soluble qui modifie les propriétés physico-chimiques de la surface, empêchant ainsi l'adhésion et la formation de biofilms par diverses bactéries, y compris *S. aureus*. De plus, un polysaccharide anti-adhésion associé au biofilm d'*E. coli* a été identifié, réduisant la susceptibilité à l'invasion et provoquant l'exclusion rapide de *S. aureus* des biofilms mixtes formés par les deux espèces (**Rendueles et al., 2011**).

Notre étude a également mis en évidence l'influence de *S. aureus* sur les populations de *P. aeruginosa*, entraînant une diminution de leur densité optique. Cette observation est en ligne avec les résultats des travaux de (**Filkins et al., 2015**) et (**Kim et al., 2015**) qui ont suggéré que, lors d'une co-culture, *P. aeruginosa* réduit la viabilité de *S. aureus* en produisant du 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxyde (HQNO) et des sidérophores. L'interaction entre ces deux espèces est complexe et peut varier selon les conditions environnementales. Cependant, selon (**Hotterbeekx et al., 2017**), *S. aureus* a également développé des stratégies pour survivre en présence de *P. aeruginosa*. L'une de ces stratégies est le passage au phénotype de petite colonie variable (PCV), un caractère bien caractérisé détecté dans diverses maladies, notamment la fibrose kystique et les infections associées aux dispositifs médicaux.

Les infections polymicrobiennes associées aux biofilms, notamment celles impliquant *C. albicans* et *S. aureus*, posent des défis thérapeutiques considérables en raison de leur capacité à former des biofilms sur les dispositifs médicaux (**Vila et al., 2021**).

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Nos résultats révèlent que les valeurs de densité optique (DO) des biofilms bi-espèces formés par *S. aureus* avec *C. albicans* ne diffèrent pas significativement de celles des biofilms monospécifiques, suggérant que l'interaction entre ces deux espèces n'a pas d'impact majeur sur la densité optique comparativement aux biofilms formés individuellement. Ces résultats corroborent les observations antérieures (*Vila et al., 2021*) montrant que les biofilms mono-espèces de *S. aureus* présentent une biomasse moindre que les biofilms mixtes de *C. albicans* et *S. aureus*, tandis que les biofilms de *C. albicans*, riches en hyphes, restent comparables entre les biofilms mono-espèces et les biofilms mixtes.

Par ailleurs, des études antérieures, notamment celle de **Peters et al., (2010)**, ont mis en évidence une coopération entre *S. aureus* et *C. albicans*, où la pathogénicité de *S. aureus* était augmentée en présence de filaments hyphaux de *C. albicans*. De plus, ils ont observé une augmentation de la virulence de *S. aureus* lors de co-infections avec *Candida albicans*. Cet effet était en partie dû à une diminution de l'activité de CodY, un répresseur transcriptionnel influençant l'expression des facteurs de virulence, ce qui entraînait par conséquent une régulation positive des expressions de virulence chez *S. aureus*.

De plus, des recherches telles que celles de **Yi Jey Lin et al., (2017)** et (**Harriott et Noverr, 2009**) ont montré que ces deux espèces peuvent former des biofilms mixtes sans antagonisme apparent, suggérant que *C. albicans* pourrait faciliter l'adhésion de *S. aureus* aux surfaces.

5. Observation microscopique des biofilms

L'association de *S. aureus* avec les souches microbiennes au sein d'un biofilm sont présentés dans les figures 11, 12 et 13.

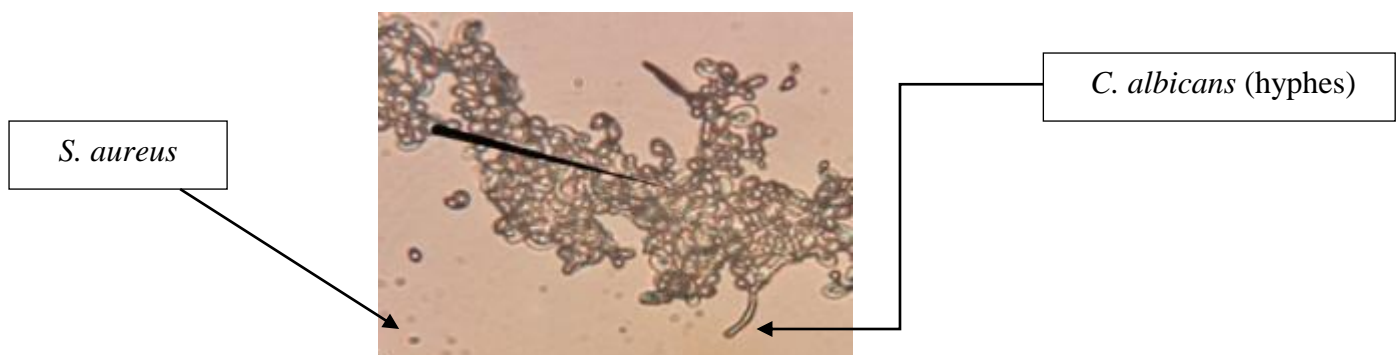


Figure (12) : Observation microscopique de biofilm mixte formé par *S. aureus* et *C. albicans*.

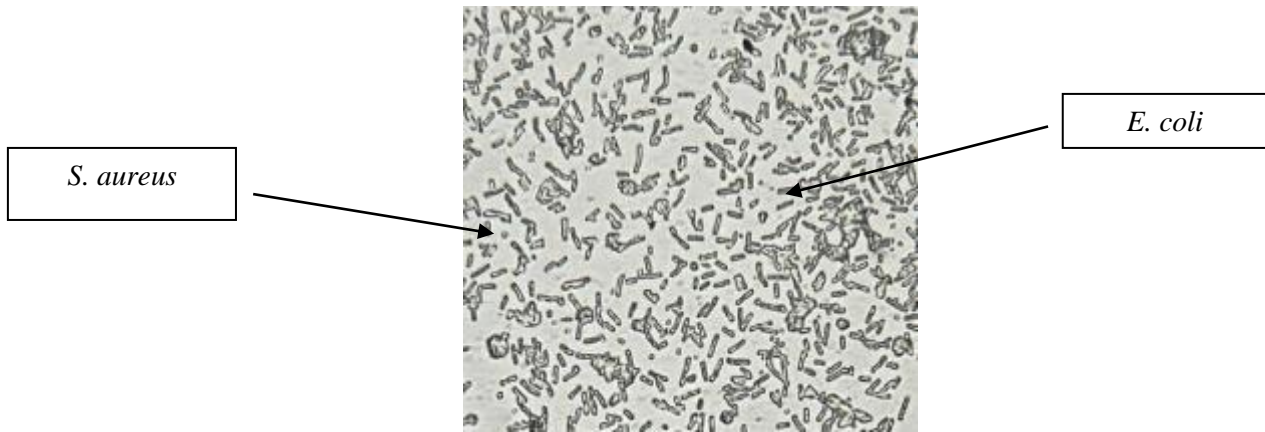


Figure (13) : Observation microscopique de biofilm mixte formé par *S. aureus* et *E. coli*.

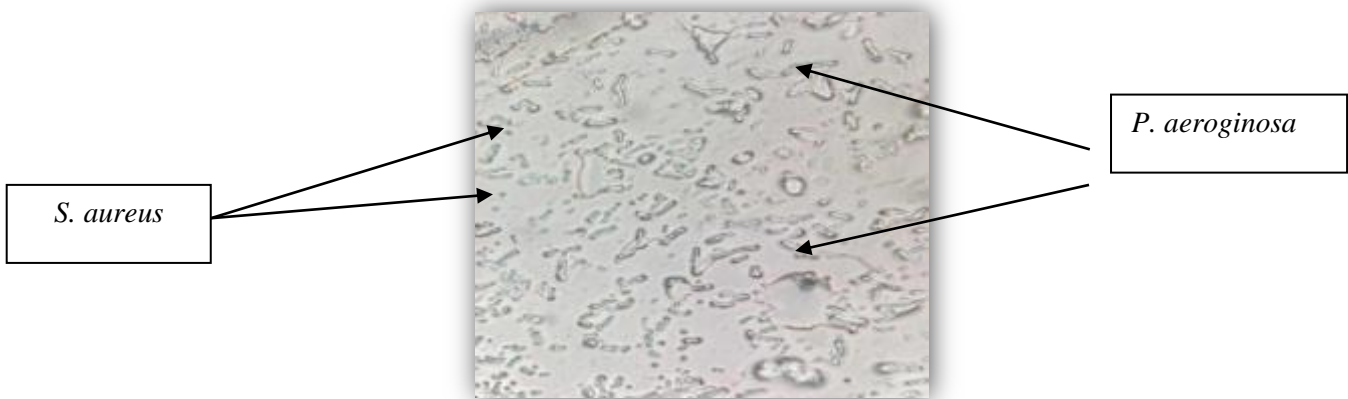


Figure (14) : Observation microscopique de biofilm mixte formé par *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

L'examen microscopique de l'interaction entre *S. aureus* et *C. albicans* a montré que les cellules sphériques de *S. aureus* s'attachaient aux hyphes de *C. albicans* (figure 12). Cependant, la présence de *S. aureus* était réduite par rapport aux cellules de PAO1, qui apparaissaient en grande abondance (figure 13). Une observation similaire a été réalisée pour l'interaction entre *S. aureus* et *E. coli*, où le nombre de cellules de *S. aureus* était limité, contrairement à celui d'*E. coli*, qui était plus élevé (figure 14).

En outre, nous avons constaté que ces interactions polymicrobiennes ne sont pas clairement visibles avec un microscope optique. Pour obtenir des images plus précises et détaillées, il est nécessaire d'utiliser des techniques d'observation plus avancées, telles que la microscopie électronique à balayage, qui fournit des images à haute résolution.

Conclusion



Conclusion

La capacité d'une souche à former des biofilms est reconnue comme un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces microbiennes. Les staphylocoques, en particulier, peuvent former des biofilms sur une grande variété de surfaces biotiques et abiotiques.

Cette étude vise à évaluer le potentiel de formation de biofilm chez *S. aureus*, ainsi que leur capacité à former des biofilms mixtes avec d'autres espèces microbiennes (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*). Pour cela, nous avons utilisé la méthode des tubes, la méthode de quantification au cristal violet et l'observation microscopique des biofilms.

Nos résultats montrent que la majorité des souches de *S. aureus*, d'origine animale et alimentaire, sont capables de former des biofilms, avec des capacités variées ou 35,71 % des souches n'ont pas formé de biofilm, 50 % ont formé un biofilm faible et 14,92 % un biofilm modéré.

Nos résultats indiquent également que les souches de *S. aureus* peuvent former des biofilms mixtes avec d'autres espèces microbiennes, avec des niveaux de production variables. Par exemple, l'interaction entre la souche animale de *S. aureus* H16 et *C. albicans* a montré une formation de biofilm mixte modérée, tandis que l'interaction entre la souche alimentaire de *S. aureus* 20 et *P. aeruginosa* ou *E. coli* montre une capacité de formation de biofilms mixtes modérée et faible, respectivement.

Ces résultats montrent que les souches de *S. aureus* ont une capacité variable à former des biofilms, ce qui peut influencer leur virulence et leur résistance aux traitements. La formation de biofilms mixtes avec d'autres micro-organismes peut également jouer un rôle important dans les infections poly-microbiennes, rendant le traitement plus complexe. Cette information est cruciale pour développer des stratégies de prévention et de traitement des infections causées par *S. aureus*.

Références bibliographiques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

Références bibliographiques:

- ABDOUKEL, A., BACHIRI, A., TOUKI, N., & HADEF, K. (2023). *Caractérisation des souches de Staphylococcus aureus résistantes impliquées dans les infections au niveau de l'hôpital d'Adrar.*
- Achek, R., Hotzel, H., Nabi, I., Kechida, S., Mami, D., Didouh, N., Tomaso, H., Neubauer, H., Ehricht, R., & Monecke, S. (2020). Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in Staphylococcus aureus isolated from different sources in Algeria. *Pathogens*, 9(2), 153.
- Anju, V., Busi, S., Imchen, M., Kumavath, R., Mohan, M. S., Salim, S. A., Subhaswaraj, P., & Dyavaiah, M. (2022). Polymicrobial infections and biofilms : Clinical significance and eradication strategies. *Antibiotics*, 11(12), 1731.
- Atriwal, T., Azeem, K., Husain, F. M., Hussain, A., Khan, M. N., Alajmi, M. F., & Abid, M. (2021). Mechanistic understanding of Candida albicans biofilm formation and approaches for its inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 12, 638609.
- Beaudoin, T., Yau, Y., Stapleton, P., Gong, Y., Wang, P., Guttman, D., & Waters, V. (2017). Staphylococcus aureus interaction with Pseudomonas aeruginosa biofilm enhances tobramycin resistance. *NPJ biofilms and microbiomes*, 3(1), 25.
- Ben Messaoud, L., & Ouchache, C. (2021). *Isolement nasal de Staphylococcus aureus chez le poulet de chair et résistance des isolats aux antibiotiques.*
- Benziane, M. Y., Bendahou, M., Benbelaïd, F., Khadir, A., Belhadeh, H., Benaïssa, A., Ouslimani, S., Mahdi, F., & Muselli, A. (2023). Efficacy of endemic Algerian essential oils against single and mixed biofilms of Candida albicans and Candida glabrata. *Archives of Oral Biology*, 145, 105584.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- Bereket, W., Hemalatha, K., Getenet, B., Wondwossen, T., Solomon, A., Zeynudin, A., & Kannan, S. (2012). Update on bacterial nosocomial infections. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 16(8).
- Bergon, L. (2016). *S. capitis, S. caprae et S. lugdunensis : Rôle dans les infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques.*
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2011). Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus* : Novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Journal of pathogens*, 2011.
- Bisognano, C. (2001). *Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de " Staphylococcus aureus " : Étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires.*
- Bose, S., Singh, D. V., Adhya, T. K., & Acharya, N. (2023). *Escherichia coli*, but Not *Staphylococcus aureus*, Functions as a Chelating Agent That Exhibits Antifungal Activity against the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Journal of Fungi*, 9(3), 286.
- Bouziane, N., & Hachour, N. (2021). *Antibiorésistance et capacité de formation de biofilm in vitro de souches de Staphylococcus aureus d'origine alimentaire et animale.*
- Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current pharmaceutical design*, 21(1), 5-11.
- Camille, D. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures.* Lavoisier.
- Castro, A., Silva, J., & Teixeira, P. (2018). *Staphylococcus aureus*, a food pathogen : Virulence factors and antibiotic resistance. In *Foodborne Diseases* (p. 213-238). Elsevier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- Cheng, X., Lu, M., Qiu, H., Li, Y., Huang, L., & Dai, W. (2022). Spontaneous quorum-sensing hierarchy reprogramming in *Pseudomonas aeruginosa* laboratory strain PAO1. *AMB Express*, *12*(1), 6.
- Cheung, G. Y., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, *12*(1), 547-569.
- da Silva, J. R., Silva, J. F. M., Pereira, M. F., Torres, A. R., Gonçalves, M. S., de Azevedo Prata, M. C., Vasconcelos Paiva e Brito, M. A., da Costa, G. M., & Ribeiro, J. B. (2024). Is *Galleria mellonella* model a good alternative to study virulence in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis? *Brazilian Journal of Microbiology*, *55*(1), 889-900.
- Dehbashi, S., Tahmasebi, H., Alikhani, M. Y., Vidal, J. E., Seifalian, A., & Arabestani, M. R. (2024). The healing effect of *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) with co-infection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* : A preclinical animal co-infection model. *Journal of Infection and Public Health*, *17*(2), 329-338.
- Deng, W., Zhou, C., Qin, J., Jiang, Y., Li, D., Tang, X., Luo, J., Kong, J., & Wang, K. (2024). Molecular mechanisms of DNase inhibition of early biofilm formation *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus* : A transcriptome analysis. *Biofilm*, *7*, 100174.
- El Naghy, W. S., Hamam, S. A., Wasfy, T. A., & Samy, S. M. (2020). Detection of Biofilm Formation by Different Bacterial Isolates of Contact Lens. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, *29*(4), 93-100.
- Filkins, L. M., Graber, J. A., Olson, D. G., Dolben, E. L., Lynd, L. R., Bhujji, S., & O'Toole, G. A. (2015). Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* drives *S. aureus* towards fermentative metabolism and reduced viability in a cystic fibrosis model. *Journal of bacteriology*, *197*(14), 2252-2264.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., & Jacques, M. (2016). Importance and control of biofilm formation by staphylococci during intra-mammary infections in dairy cows : A review of literature. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 167(7/8), 216-229.
- Grace, D., & Fetsch, A. (2018). Staphylococcus aureus—A foodborne pathogen : Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control : An overview. *Staphylococcus aureus*, 3-10.
- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009). Candida albicans and Staphylococcus aureus form polymicrobial biofilms : Effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 3914-3922.
- Hotterbeekx, A., Kumar-Singh, S., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2017). In vivo and In vitro Interactions between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus spp. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 106.
- Kara, T. (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.*
- Kiedrowski, M. R., & Horswill, A. R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 104-121.
- Kim, S., Yoon, Y., & Choi, K.-H. (2015). Pseudomonas aeruginosa DesB promotes Staphylococcus aureus growth inhibition in coculture by controlling the synthesis of HAQs. *PloS one*, 10(7), e0134624.
- Kulshrestha, A., & Gupta, P. (2023). Combating polymicrobial biofilm : Recent approaches. *Folia Microbiologica*, 68(4), 495-505.
- Makovcova, J., Babak, V., Kulich, P., Masek, J., Slany, M., & Cincarova, L. (2017). Dynamics of mono-and dual-species biofilm formation and interactions between

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- Staphylococcus aureus and Gram-negative bacteria. *Microbial biotechnology*, 10(4), 819-832.
- Mariani, F., & Galvan, E. M. (2023). Staphylococcus aureus in Polymicrobial Skin and Soft Tissue Infections : Impact of Inter-Species Interactions in Disease Outcome. *Antibiotics*, 12(7), 1164.
- McConoughey, S. J., Howlin, R., Granger, J. F., Manring, M. M., Calhoun, J. H., Shirtliff, M., Kathju, S., & Stoodley, P. (2014). Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future microbiology*, 9(8), 987-1007.
- Mekhloufi, O. A., Chieffi, D., Hammoudi, A., Bensefia, S. A., Fanelli, F., & Fusco, V. (2021). Prevalence, enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from Algerian ready to eat foods. *Toxins*, 13(12), 835.
- Millezi, F., Pereira, M. O., Batista, N., Camargos, N., Auad, I., Cardoso, M., & Piccoli, R. (2012). Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to essential oils. *Journal of Food Safety*, 32(3), 351-359.
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), Article 6.
- Nair, N., Biswas, R., Götz, F., & Biswas, L. (2014). Impact of Staphylococcus aureus on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infection and immunity*, 82(6), 2162-2169.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 47, e2437.
- Otto, M. (2010). Novel targeted immunotherapy approaches for staphylococcal infection. *Expert opinion on biological therapy*, 10(7), 1049-1059.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- Otto, M. (2013). Staphylococcal infections : Mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.
- Otto, M. (2018). Staphylococcal biofilms. *Microbiology spectrum*, 6(4), 10-1128.
- Pereira, R., Dos Santos Fontenelle, R., De Brito, E., & De Morais, S. (2021). Biofilm of *Candida albicans* : Formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11-22.
- Ploy, M.-C., Poyart, C., Cattoir, V., Denis, F., & Martin, C. (2016). *Bactériologie médicale : Techniques usuelles*. Elsevier Health Sciences.
- Pompermayer, D. M., & Gaylarde, C. C. (2000). The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*, 17(4), 361-365.
- Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E., & Ghigo, J.-M. (2011). Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. *MBio*, 2(3), 10-1128.
- Rewatkar, A., & Wadher, B. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. *J Pharm Biol Sci*, 8(5), 36-40.
- Ribeiro, M., Monteiro, F. J., & Ferraz, M. P. (2012). Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter*, 2(4), 176-194.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms : A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522-554.
- Shenkman, B., Rubinstein, E., Cheung, A. L., Brill, G. E., Dardik, R., Tamarin, I., Savion, N., & Varon, D. (2001). Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- flow conditions : Roles of agr and sar loci, platelets, and plasma ligands. *Infection and immunity*, 69(7), 4473-4478.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- Todd, O. A., & Peters, B. M. (2019). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* pathogenicity and polymicrobial interactions : Lessons beyond Koch's postulates. *Journal of Fungi*, 5(3), 81.
- Tuon, F. F., Suss, P. H., Telles, J. P., Dantas, L. R., Borges, N. H., & Ribeiro, V. S. T. (2023). Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antibiotics*, 12(1), 87.
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., & Ghigo, J.-M. (2006). Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12558-12563.
- Vila, T., Kong, E. F., Montelongo-Jauregui, D., Van Dijck, P., Shetty, A. C., McCracken, C., Bruno, V. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2021). Therapeutic implications of *C. albicans*-*S. aureus* mixed biofilm in a murine subcutaneous catheter model of polymicrobial infection. *Virulence*, 12(1), 835-851.
- Wang, X., Preston III, J. F., & Romeo, T. (2004). The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 186(9), 2724-2734.
- Zhang, Y., Xu, D., Shi, L., Cai, R., Li, C., & Yan, H. (2018). Association between agr type, virulence factors, biofilm formation and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from pork production. *Frontiers in microbiology*, 9, 368823.

Annexes



Annexes : Compositions des milieux de culture

- **Milieu chapman**

Pour 1 litre de milieu (pH final : 7,4)

Peptone	10 g
Extrait de viande de bovin.....	1 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Gélose	15 g

L'autoclave 15 minutes à 121C°

- **Milieu Sabouraud**

Pour 1 litre de milieu (Ph=5.6)

Peptone	10 g
glucose	40 g
agar	15 g

L'autoclave 15 minutes à 121C°

- **Milieu BHI (brain heart infusion broth)**

Pour 1 litre de milieu (Ph=7.4)

Peptone	10 g
Infusion de coeur de porc	10 g
Infusion de cervelle de porc.....	7.4 g
Dextrone.....	02 g

Chlorure de sodium.....05

Disodique phosphate

2.5

L'autoclave 15 minutes à 121C°

ANNEXES

Annexe 02 : Formation des biofilms

Tableaux : Résultats détaillés de la formation de biofilm pour les souches de *S. aureus* (souches alimentaires et animales) et les souches de référence

Souche alimentaire	Moyenne de la DO	Formation du biofilm
SA 10	0,019	Non formatrice
SA 46	0,015	Non formatrice
SA 08	0,016	Non formatrice
SA18	0,006	Non formatrice
SA 04	0,014	Non formatrice
SA 51	0,017	Non formatrice
SA02	0,021	Non formatrice
SA 20	0,029	faible

Souches animales	Moyenne de la DO	Formation du biofilm
SA H19	0,023	Non formatrice
SA H20	0,046	Faible
SA H09	0,053	Faible
SA H11	0,0516	Faible
SAH 01	0,028	Faible
SAH 21	0,073	Modéré
SAH 10	0,050	Faible
SAH 03	0,027	Faible
SAH 16	0,040	Faible
SAH 04	0,027	Faible
SAH 18	0,051	Faible
SAH 06	0,025	Non formatrice
SAH 08	0,025	Non formatrice
SAH 17	0,059	Modéré
SAH 12	0,029	Faible
SAH 02	0,036	Faible
SAH 14	0,044	Faible
SAH 13	0,043	Faible
SAH	0,069	Modéré
SAH 15	0,088	Modéré

Souche de référence	Moyenne de la DO	Formation du biofilm
SA	0,033	faible
SN	0,037	faible
EA	0,062	Modéré
EN	0,049	Faible
PAOI	0,139	Forte
DSM	0,397	Forte
CA	0,084	Modéré
M3	0,098	Modéré

Annexe 03 : Images

Figure : Souche de *S. aureus* d'origine alimentaire sur milieu chapman

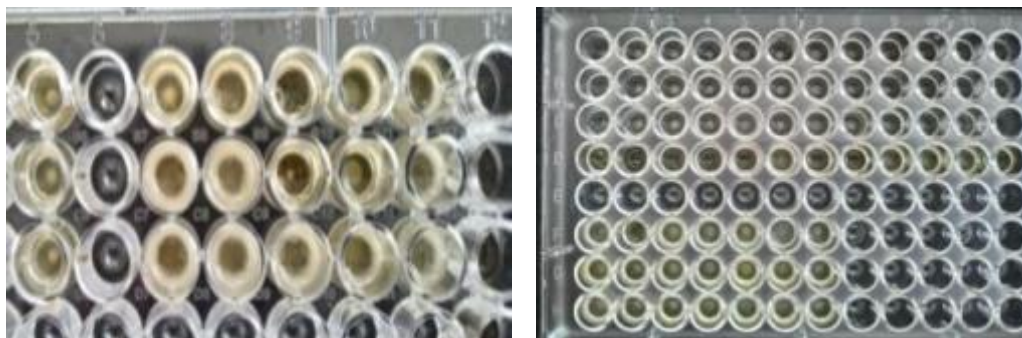


Figure : Développement du biofilm sur les microplaques à 96 puits

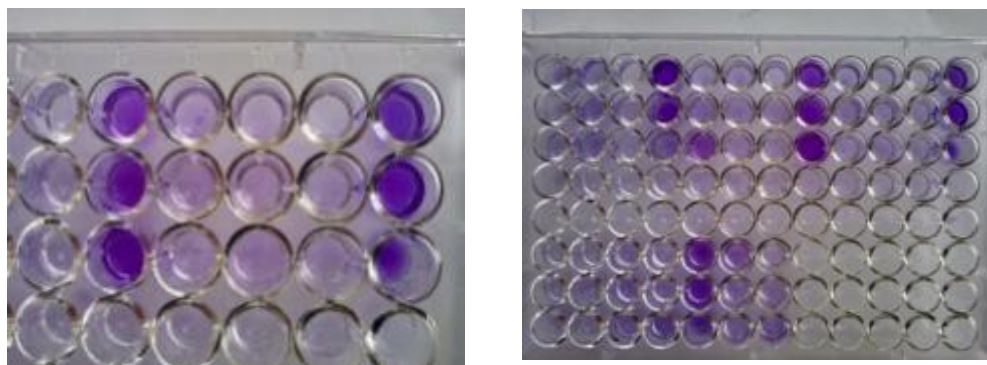


Figure : Quantification des biofilms par Crystal violet



Figure : Mesure de la densité optique du biofilm sur l'appareil de spectrophotomètre (lecteur de microplaque)

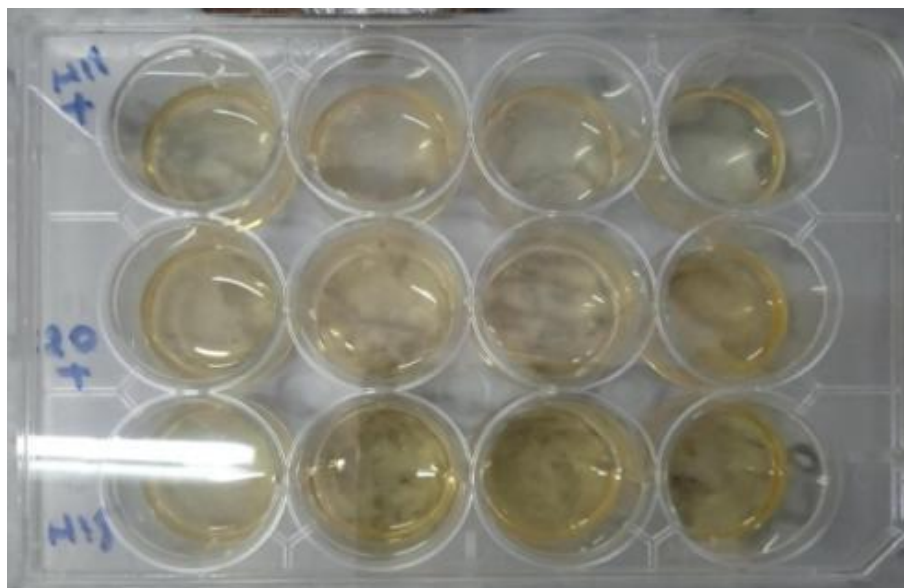


Figure : Formation des biofilms sur des microplaques a 12 puits.