

Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences de la nature, de la vie, des sciences de la terre et de
l'univers
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2025

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Mansouri Amani – Meddour khaoula

Le : 03-06-2025

Évaluation de l'effet de la température et le temps d'incubation sur la formation de biofilm par les souches Enterobacter et staphylocoques

Jury :

Mme	WARDA KHERROUR	Grade	Université de Biskra	Président
Mme	SARA BOULMAIZ	MAB	Université de Biskra	Encadrante
Mme	NASSIMA BENAMEUR	Grade	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Avant tout, nous exprimons notre gratitude à Allah, le Tout-Puissant, pour nous avoir guidés, inspirés et accordé la force nécessaire à l'accomplissement de ce travail, qui n'était qu'un projet lointain devenu aujourd'hui une réalité concrète.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à notre encadrante, Madame Boulmaïz Sara, maître de conférences à l'Université Mohamed Khider - Biskra, pour son encadrement rigoureux, son accompagnement constant et son soutien précieux, aussi bien sur le plan scientifique que moral. Sa disponibilité, ses orientations pertinentes et son engagement ont été des atouts majeurs dans la réalisation de ce mémoire.

Nos remerciements vont également au laboratoire de recherche de la Faculté, où se sont déroulées les étapes expérimentales de ce travail. Nous remercions l'ensemble de l'équipe pour les moyens mis à notre disposition, ainsi que pour l'accueil et l'environnement de travail favorable qui ont largement contribué à la qualité de nos recherches.

Nous exprimons également notre gratitude à tous les enseignants de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie de Hadjeb - Biskra, pour les savoirs transmis et les compétences acquises tout au long de notre parcours académique.

Enfin, nous adressons nos sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Leurs remarques, observations et suggestions nous ont permis d'enrichir notre réflexion et d'approfondir certains aspects essentiels de notre étude

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à cette part de moi qui a résisté, malgré les tempêtes, malgré les doutes et les silences pesants. À celle qui, même fatiguée, a continué à croire qu'au bout de chaque nuit se cache une aube nouvelle. Ce travail est né de tant de luttes discrètes, de courage silencieux, d'une détermination souvent invisible aux yeux des autres. Je me rends hommage à travers ces pages, avec tendresse et fierté.

Je pense aussi, avec une profonde gratitude, à ma mère, dont l'amour m'a enveloppé comme un manteau dans les jours les plus froids. Sa présence, ses prières murmurées, son regard empli de confiance ont été mon refuge et ma force. À mon père, dont la sagesse tranquille et le soutien discret ont planté en moi les graines de la persévérance, je rends un hommage silencieux, mais essentiel.

Mes frères et sœurs, complices de vie, porteurs de sourires sincères, témoins de mes silences et de mes éclats, vous étiez là, souvent sans le dire, toujours à votre manière. Votre affection m'a portée plus que vous ne pouvez l'imaginer.

Et puis, à toutes celles et ceux qui, d'un mot, d'un geste ou d'un simple regard, m'ont rappelé que je n'étais pas seule sur ce chemin... votre bienveillance a laissé une trace, subtile mais précieuse, dans ce voyage que fut la création de ce mémoire

Table de matières

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Table de matières

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	2
Problématique.....	2
partie 1 . Synthèse bibliographie	
chapitre 1 : biofilm	3
1 . Historique :.....	3
2. Définition	3
3. Formation de biofilm.....	4
3.1. Attachement réversible	4
3.2. Attachement irréversible et formation de microcolonies	4
3.3. Maturation	5
3.4. Dispersion.....	5
4. Morphologie du biofilm	6
5. Caractéristiques du biofilm	6
7. Détection du biofilm.....	7
7.1. Détection qualitative : méthode de l'agar Congo Red (CRA)	7
7.2. Détection quantitative : test en microplaque	7
chapitre 2 : staphylocoques et enterobacter	10
1 . Staphylocoques :	10

1.1.Définition	10
1.2.Habitat naturel	10
1.3.Classification	10
1.4.Pathogénicité	11
1.5.Manifestations cliniques	12
2.Enterobactéries	12
2.1.Définition	13
2.2.Classification	13
2.3.Pouvoir pathogène et types d'infections	14
2.4.Manifestations cliniques	14
2.5.Mode de transmission	15
chapitre 3 : methodologie	16
1.Préparation des milieux MacConkey	16
2.Préparation des milieux EMB	16
3. purification des souches d' <i>Enterobacter</i>	16
3.1. MacConkey agar.....	16
3.2. EMB agar.....	17
3.3. Procédure d'isolement.....	17
4. Conservation des souches bactériennes pures	17
5. Identification biochimique système API 20 E	17
6.Test de mucoviscosité	18
7. Purification des souches de Staphylococcus	18
8. Préparation du milieu Rouge Congo (CRA)	19
9. Détection de la formation de biofilm (méthode qualitative sur milieu Rouge Congo)	19
10. Préparation du milieu TBS	19
11. Détection quantitative de la formation du biofilm par la méthode des microplaques.....	20
12. Traitement statistique des résultats : ANOVA factorielle	20
chapitre 4 : Résultats et Discussion.....	22
1. Purification d'isolats	Error! Bookmark not defined.
2. Identification biochimique par la galerie API 20E	23

3. Test de Mucoviscosité :	27
4. Détection qualitative du biofilm par milieu Rouge congo :	29
5. Test quantitatif de formation du biofilm (Microtiter Plate Assay) :.....	32
5.1 Implications pratiques et cliniques	37
6. Les limites de l'étude	38
7. Perspectives	38
Conclusion.....	40

Référence

Annexe

Liste de tableau

Tableau 1. Identification des entérobactéries par la galerie API 20E.

Tableau 2. Répartition des souches selon la couleur des colonies sur milieu CRA et leur interprétation

Tableau 3. Les effets de la température, du temps d'incubation sur la formation de biofilm des isolats d'Entérobactéries et Staphylocoques.

Tableau 4. Les densités optiques moyennes des différents phénotypes de biofilm.

Liste de figures

Figure 1. Les etapes de formation du biofilm

Figure 2. Aspect morphologique des colonies bactériennes après purification sur milieux sélectifs.

Figure 3. Résultats visuels des galeries API 20E pour l'identification biochimique de certaines souches entérobactériennes.

Figure 4. Évaluation comparative de la mucoviscosité (%) de différentes souches bactériennes.

Figure 5. Exemples typiques de colonies de différentes couleurs observées sur milieu CRA après 48 heures d'incubation. (Arciola et al., 2002).

Figure 6. Histogramme de Répartition des souches d'Enterobacter selon leur capacité d'adhésion dans différentes conditions d'incubation.

Figure 7 : Effet combiné de la température et la durée d'incubation sur la densité optique mesurant la formation du biofilm.

Liste des abréviations

BHI : Brain Heart Infusion

CRA : Congo Red Agar

CTX-M : Cefotaximase-Munich

DO : Densité Optique (Optical Density)

DOc : Densité Optique corrigée (Corrected Optical Density)

Fc : Fragment crystallizable

LB : Luria-Bertani Broth

LPS : Lipopolysaccharide

MA : Moderately Adherent

NA : Non-Adherent

SA : Strongly Adherent

SHV : Sulfhydryl Variable beta-lactamase

TEM : Temoniera beta-lactamase

TSB : Tryptic Soy Broth

UPEC : Uropathogenic Escherichia coli

WA : Weak Adherent

LDC : Lysine Decarboxylase

ODC : Ornithine Decarboxylase

EPS : Exopolysaccharides

CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

ADN : Acide Désoxyribonucléique

EMB : Eosin Methylene Blue

API 20 E :Analytical Profile Index 20 Enterobacteriaceae

ADH :Arginine Dihydrolase

TSB : Tryptic Soy Broth

PSB : phosphate buffred saline

icaA :Intracellular Adhesion gene A

nap : Nitrate Reductase Accessory Protein

fimH : Fimbrial Adhesion Protein H

csgD : Curli Subunit Gene D

PCR : Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR : Reverse Transcription quantitative PCR

pH :Potential of Hydrogen

Introduction

Introduction

Les biofilms bactériens représentent une forme sophistiquée d'adaptation microbienne aux conditions environnementales défavorables. Ces structures sont constituées de communautés de cellules bactériennes enchâssées dans une matrice extracellulaire de polymères, leur conférant une résistance accrue aux agents antimicrobiens et aux stress physiques (Costerton et al., 1999). Ce phénomène constitue une problématique majeure aussi bien dans le domaine médical que dans le secteur agroalimentaire, notamment en raison de sa contribution à la persistance des infections nosocomiales et à la contamination des surfaces de transformation alimentaire (Donlan & Costerton, 2002a).

Parmi les bactéries les plus fréquemment impliquées dans la formation de biofilms, on retrouve les genres *Staphylococcus* et *Enterobacter*. Ces deux genres sont d'une grande importance en microbiologie médicale et alimentaire. *Staphylococcus* spp., notamment *S. aureus*, est largement reconnu pour sa capacité à former des biofilms sur les dispositifs médicaux et à causer des infections nosocomiales persistantes (Otto, 2018). De son côté, *Enterobacter* spp. est capable de former des biofilms sur des surfaces alimentaires, contribuant ainsi à la persistance de pathogènes dans les chaînes de production alimentaire et à des cas de toxi-infections d'origine alimentaire (Capita et al., 2020; Kim et al., 2006).

La capacité de ces micro-organismes à former un biofilm peut varier en fonction de nombreux facteurs, notamment la température, le temps d'incubation, le type de surface, et les conditions nutritionnelles du milieu. Plusieurs études ont montré que la température d'incubation ainsi que la durée de contact avec le support jouent un rôle clé dans le processus d'adhésion bactérienne et le développement du biofilm (Nyenje et al., 2013a). Ces paramètres peuvent non seulement influencer la densité du biofilm, mais aussi son architecture et sa virulence potentielle.

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer l'effet de deux températures d'incubation (25 °C et 37 °C) ainsi que deux durées (24 h et 48 h) sur la capacité de formation de biofilms chez des souches de *Staphylococcus* et *Enterobacter* isolées à partir d'échantillons d'origine alimentaire et hospitalière. Pour ce faire, nous avons eu recours à deux méthodes de détection couramment utilisées dans la caractérisation des biofilms : le test en microplaque (microtiter plate assay) pour

une quantification spectrophotométrique, et le milieu rouge Congo (Congo Red Agar), qui permet une différenciation phénotypique des souches productrices de biofilm.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche appliquée visant à mieux comprendre l'influence de certains paramètres environnementaux sur la virulence et la persistance des agents pathogènes dans divers contextes. Les résultats attendus pourraient contribuer à améliorer les stratégies de prévention et de contrôle des contaminations en milieu hospitalier et dans l'industrie alimentaire, où la gestion des biofilms constitue un enjeu crucial.

Problématique

Malgré les nombreuses études consacrées aux biofilms bactériens, les conditions spécifiques qui favorisent leur formation chez différentes espèces et dans divers milieux restent encore mal élucidées. Cela soulève la question suivante :

Comment les variations de température et de durée d'incubation influencent-elles la capacité de formation de biofilms chez les souches de *Staphylococcus* et *Enterobacter* isolées des milieux alimentaires et hospitaliers ?

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Chapitre 1 : Biofilm

1. Historique :

Le concept de biofilms n'est pas nouveau, mais la compréhension scientifique de leur structure et de leur fonction a considérablement évolué au cours du siècle dernier. Les premières observations d'agrégats microbiens sur des surfaces ont été faites à la fin du XVIIIe siècle par Antonie van Leeuwenhoek, qui utilisait des microscopes primitifs pour décrire des « animalcules » adhérant à la plaque dentaire. Cependant, ces observations étaient en grande partie anecdotiques et n'ont pas été poursuivies de manière systématique avant le XXe siècle. (Costerton et al., 1995).

La reconnaissance scientifique moderne des biofilms a commencé à se concrétiser dans les années 1970, avec les travaux pionniers de J. William Costerton, qui a introduit le concept de communautés microbiennes sessiles enfermées dans des substances polymériques extracellulaires. Son article de 1978, rédigé avec ses collègues dans la revue *Science*, a marqué un tournant en établissant que les bactéries adhèrent préférentiellement aux surfaces et forment des communautés organisées, enfermées dans une matrice. (Costerton et al., 1987).

Au cours des années 1980 et 1990, les avancées en microscopie—en particulier la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) ont permis une visualisation détaillée de l'architecture des biofilms et ont confirmé leur complexité. Cette période a également vu le développement de modèles *in vitro* et de méthodes quantitatives pour étudier les biofilms dans des conditions contrôlées. (Donlan, 2002).

Au début des années 2000, la recherche sur les biofilms était devenue une pierre angulaire de la microbiologie, avec des implications en médecine, dans l'industrie et en science de l'environnement. Les biofilms étaient de plus en plus reconnus comme un facteur majeur dans les infections chroniques, la résistance aux antibiotiques et les processus d'encrassement biologique. Aujourd'hui, les études sur les biofilms intègrent les technologies génomiques, protéomiques et d'imagerie pour élucider leurs mécanismes moléculaires et développer des stratégies de contrôle ciblées. (Hall-Stoodley et al., 2004).

2. Définition

Un biofilm est une communauté structurée et dynamique de micro-organismes qui s'attachent à des surfaces biotiques ou abiotiques et deviennent enfermés dans une matrice auto-

produite de substances polymériques extracellulaires (EPS), principalement composée de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire. (Flemming et al., 2016). Cette matrice ne se contente pas de maintenir les cellules ensemble, elle les protège également contre les stress environnementaux, y compris les antibiotiques et les défenses immunitaires de l'hôte. (Donlan & Costerton, 2002b). Comparées aux bactéries planctoniques (flottant librement), les cellules au sein d'un biofilm présentent une expression génétique et des caractéristiques phénotypiques modifiées, ce qui entraîne une résistance accrue et une capacité de survie renforcée. (Hall-Stoodley et al., 2004). Le développement d'un biofilm progresse généralement à travers plusieurs étapes : l'attachement initial, la formation de microcolonies, la maturation en une structure tridimensionnelle complexe, puis le détachement ou la dispersion éventuelle. (Vani et al., 2023).

3. Formation de biofilm

La formation de biofilm est un processus complexe et en plusieurs étapes qui permet aux micro-organismes de passer d'un état libre (planctonique) à des communautés structurées fixées à une surface. Cette transformation améliore la survie microbienne face à divers stress environnementaux et contribue à leur persistance dans des environnements variés, notamment médicaux, industriels et naturels.

3.1. Attachement réversible

La première étape implique l'adhésion transitoire des micro-organismes planctoniques à une surface. Cet attachement réversible est médié par des interactions physico-chimiques faibles, telles que les forces de van der Waals, les interactions électrostatiques et les effets hydrophobes. Des appendices microbiens comme les flagelles, pili et fimbriae facilitent ce processus en surmontant les forces répulsives et en favorisant un contact étroit avec la surface. À ce stade, les cellules peuvent facilement se détacher et revenir à l'état planctonique si les conditions sont défavorables. (Donlan, 2002).

3.2. Attachement irréversible et formation de microcolonies

Lorsque les conditions sont favorables, l'attachement devient irréversible. Les micro-organismes commencent à produire des substances polymériques extracellulaires (EPS), qui les ancrent solidement à la surface et les uns aux autres, formant des microcolonies. Les EPS,

composées de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire, assurent la stabilité structurelle et facilitent la rétention des nutriments ainsi que l'élimination des déchets au sein du biofilm en développement. (Flemming & Wingender, 2010). Le quorum sensing, un mécanisme de communication intercellulaire, joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression génétique liée à la production d'EPS et à la maturation du biofilm. (Miller & Bassler, 2001).

3.3. Maturation

À mesure que les microcolonies se développent, le biofilm mûrit pour former une structure tridimensionnelle complexe. Des canaux et des pores se développent au sein de la matrice EPS, permettant la distribution des nutriments et l'élimination des déchets. Le biofilm présente une hétérogénéité spatiale, avec des gradients d'oxygène et de nutriments conduisant à des communautés microbiennes différenciées. Cette phase de maturation renforce la résistance du biofilm aux agents antimicrobiens et aux stress environnementaux. (Hall-Stoodley et al., 2004).

3.4. Dispersion

Dans la phase finale, les cellules se dispersent à partir du biofilm mature pour coloniser de nouvelles niches. La dispersion peut être déclenchée par divers facteurs, notamment l'épuisement des nutriments, l'accumulation de déchets et les changements des conditions environnementales. La dégradation enzymatique de la matrice EPS et l'expression des gènes liés à la motilité facilitent le détachement des cellules du biofilm. Cette dispersion est essentielle à la propagation des infections associées aux biofilms et à l'encrassement biologique dans les systèmes industriels. (Kaplan, 2010).

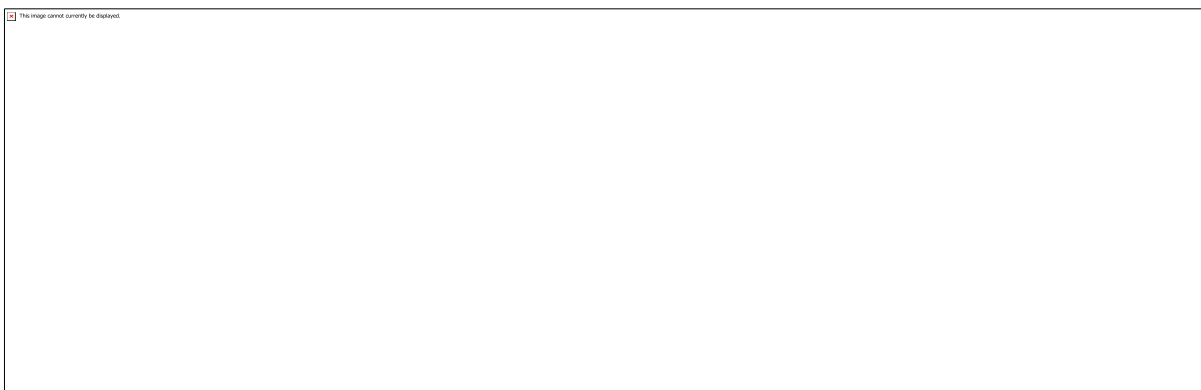


Figure 1 : Les étapes de formation du biofilm(Rather et al., 2021).

4. Morphologie du biofilm

La morphologie d'un biofilm est très dynamique et dépend de divers facteurs, notamment les espèces microbiennes, les propriétés de la surface, les conditions environnementales et la disponibilité des nutriments. Les biofilms matures présentent généralement une structure tridimensionnelle hétérogène, composée de microcolonies séparées par des canaux d'eau qui facilitent les échanges de nutriments et de déchets. (Hall-Stoodley et al., 2004). Ces caractéristiques structurelles ne sont pas distribuées de manière aléatoire ; elles résultent plutôt d'une croissance microbienne coordonnée et de la production de substances polymériques extracellulaires (EPS), qui agissent comme un échafaudage soutenant l'architecture du biofilm. (Flemming & Wingender, 2010).

Les biofilms peuvent adopter diverses formes morphologiques telles que des couches plates, des structures en forme de champignon et des formations en forme de tour, en fonction de la dynamique d'écoulement et des irrégularités de la surface. (Stoodley et al., 2002). La microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) ont révélé que les biofilms sont composés d'agrégats denses de cellules bactériennes enchâssées dans une matrice qui offre une protection contre les stress externes, notamment les antibiotiques et les forces de cisaillement. (Lawrence et al., 1991).

De plus, la matrice du biofilm contribue à la différenciation spatiale au sein de la communauté, conduisant à une hétérogénéité physiologique entre les cellules, même au sein de la même microcolonie. Cette hétérogénéité est essentielle à la résilience du biofilm et à sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales changeantes. (Stewart et Franklin, 2008).

5. Caractéristiques du biofilm

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes caractérisées par plusieurs traits distinctifs qui les différencient des bactéries planctoniques (libres). L'un des traits les plus remarquables est la présence d'une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS), qui entoure et protège les cellules bactériennes. Cette matrice, principalement composée de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire, contribue à l'intégrité structurelle du biofilm et constitue une barrière contre les agents antimicrobiens et les réponses immunitaires de l'hôte. (Flemming et Wingender, 2010).

Un autre trait clé est l'hétérogénéité spatiale et physiologique au sein du biofilm. Les cellules situées dans différentes régions du biofilm présentent des niveaux variables d'activité métabolique, d'expression génétique et de réponses au stress en raison de gradients en nutriments, en oxygène et en produits de déchets. Cette hétérogénéité renforce la résilience et l'adaptabilité des biofilms dans des environnements hostiles. (Stewart et Franklin, 2008).

La communication intercellulaire, notamment via le quorum sensing, est essentielle au développement et au maintien du biofilm. Cette communication permet aux bactéries de coordonner collectivement l'expression génétique, influençant des comportements tels que la production d'EPS, l'expression des facteurs de virulence et la dispersion. (Miller et Bassler, 2001).

Les biofilms présentent également une résistance accrue aux antibiotiques et aux stress environnementaux par rapport aux cellules planctoniques. Cette résistance ne résulte pas uniquement de la matrice protectrice d'EPS, mais aussi de taux de croissance modifiés, de la présence de cellules persister et de l'activation de gènes de résistance spécifiques. (Mah & O'Toole, 2001).

7. Détection du biofilm

7.1. Détection qualitative : méthode de l'agar Congo Red (CRA)

La méthode de l'agar Congo Red est une technique qualitative basée sur la capacité des bactéries à produire des exopolysaccharides, qui se lient au colorant Congo red. Lorsqu'elles sont ensemencées sur un milieu CRA, les souches productrices de biofilm forment généralement des colonies noires, sèches et cristallines, tandis que les non-productrices forment des colonies rouges ou roses. (Freeman et al., 1989a). Cette méthode est particulièrement utile pour le dépistage rapide de *Staphylococcus aureus* et des staphylocoques à coagulase négative, bien que sa sensibilité puisse varier en fonction des espèces et des conditions de croissance. (Mathur et al., 2006).

7.2. Détection quantitative : test en microplaque

La méthode en microplaque est un test quantitatif standard pour évaluer la biomasse du biofilm. Les cultures bactériennes sont incubées dans des plaques à 96 puits, permettant la formation de biofilms sur les surfaces des puits. Après incubation, les puits sont lavés pour éliminer les cellules planctoniques, et le biofilm restant est coloré au violet de cristal. Le colorant est ensuite solubilisé, et la densité optique (DO) est mesurée par spectrophotométrie, généralement à 570 ou

595 nm. Cette méthode offre une approche fiable, reproductible et évolutive pour comparer les capacités de formation de biofilm entre différentes souches ou conditions de traitement. (Stepanovic et al., 2000).

Chapitre 2

Chapitre 2 : Staphylocoque et Entérobactéries

1 . Staphylocoques

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des agents pathogènes de l'homme et d'autres mammifères.(Foster, 1996). La propension de *Staphylococcus aureus* à adhérer aux biomatériaux, notamment à la matrice extracellulaire et aux protéines plasmatiques, joue un rôle crucial dans la pathogénèse des infections liées aux dispositifs orthopédiques. *S. aureus* possède de nombreuses protéines d'adhésion à sa surface, mais on ignore comment elles interagissent pour créer des connexions persistantes avec le substrat.(Harris et al., 2002)

1.1.Définition

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, anaérobies facultatifs, immobiles et ne produisant pas de spores, se développant par fermentation ou respiration aérobie. Un complexe apparenté est présent chez la plupart des animaux. nécessitent des nutriments spécifiques, mais en général, ils ont besoin d'une source organique d'azote, fournie par cinq à douze acides aminés essentiels, tels que l'arginine et la valine, ainsi que par des vitamines B, comme la nicotinamide et la thiamine. (Kloos et Schleifer, 1986)

Ils forment des amas, des paires et parfois de courtes chaînes. Les staphylocoques se divisent en deux plans, ce qui entraîne la formation d'amas.(Foster, 1996)

1.2.Habitat naturel

S. aureus colonise les fosses nasales et les aisselles. *S. epidermidis* est un commensal cutané fréquent. D'autres espèces de staphylocoques sont des commensaux humains rares. Certains sont commensaux avec d'autres animaux.(Foster, 1996)

1.3.Classification

Le genre *Staphylococcus* appartient au domaine des bactéries et est classé dans l'embranchement des Bacillota (anciennement connu sous le nom de Firmicutes), la classe des Bacilli, l'ordre des Bacillales et la famille des Staphylocoques. Ce genre comprend un grand nombre d'espèces, dont la plus importante est *Staphylococcus aureus*.(Foster, 1996)

Traditionnellement, elles étaient divisées en deux groupes selon leur capacité à coaguler le plasma sanguin (réaction de coagulase). *S. aureus* et *S. intermedius* sont coagulase positive. Tous

les autres staphylocoques sont coagulase négative comprennent plus de 30 autres espèces. Ils sont fréquemment hémolytiques et tolérants au sel. Une analyse du biotype est nécessaire pour leur identification.(Foster, 1996)

1.4.Pathogénicité

Staphylococcus aureus exprime de nombreuses protéines de surface cellulaire et extracellulaires qui constituent des facteurs de virulence potentiels. La physiopathologie de la plupart des maladies causées par cette bactérie est complexe. Il est donc difficile d'identifier précisément la fonction de chaque élément.(Foster, 1996)

1.4.1.facteurs de virulence de S. aureus :

- Adhérence :

L'agent pathogène doit pénétrer dans l'hôte et adhérer aux tissus ou aux cellules de l'hôte pour déclencher une infection. Des protéines comme la laminine et la fibronectine, composants de la matrice extracellulaire, sont exprimées à la surface des cellules de S. aureus et facilitent l'adhésion aux protéines de l'hôte. La fibronectine est un composant des caillots sanguins et se trouve à la surface des cellules épithéliales et endothéliales. De plus, la majorité des souches présentent le facteur d'agglutination, une protéine de liaison fibrinogène/fibrine qui facilite l'adhésion aux caillots sanguins et aux tissus lésés. La fibronectine et les protéines de liaison au fibrinogène sont exprimées par la majorité des souches de S. aureus.(Foster, 1996)

- Évitement des défenses de l'hôte :

S. aureus exprime un certain nombre de facteurs susceptibles d'interférer avec les mécanismes de défense de l'hôte.

-Polysaccharide capsulaire :

Un polysaccharide de surface de sérotype 5 ou 8 est exprimé par la plupart des isolats cliniques de Staphylococcus aureus. Contrairement aux nombreuses capsules d'autres bactéries, visibles en microscopie optique mais qui perdent rapidement leur intégrité lors des repiquages en laboratoire, cette capsule est appelée microcapsule, car elle n'est visible qu'en microscopie électronique après marquage par anticorps.

-Protéine A :

La protéine A est une protéine de surface de *S. aureus* qui se lie aux molécules d'immunoglobuline G via la région Fc. Ce processus non immunitaire conduit les bactéries sériques à se lier aux molécules d'IgG de manière incorrecte. En théorie, cela altère l'opsonisation et la phagocytose.

-Leucocidine :

Staphylococcus aureus peut produire une toxine ciblant particulièrement les leucocytes polynucléaires. La phagocytose est un moyen de défense essentiel contre l'infection staphylococcique ; la leucocidine doit donc être considérée comme un facteur de virulence.(Foster, 1996).

1.5.Manifestations cliniques

De nombreux types d'infections peuvent être provoqués par les staphylocoques. *S. aureus* génère des abcès localisés à divers endroits et des maladies cutanées superficielles (furoncles, orgelets). *S. aureus* est la source d'infections cutanées plus graves (furonculose) ainsi que de maladies profondes telles que l'ostéomyélite et l'endocardite.(Foster, 1996)

Avec *S. epidermidis*, *S. aureus* est un contributeur majeur aux infections nosocomiales des plaies chirurgicales et aux infections liées aux dispositifs médicaux à demeure. En libérant des entérotoxines dans les aliments, *S. aureus* provoque une intoxication alimentaire.(Lyon & Skurray, 1987).

S. aureus libère des superantigènes dans la circulation sanguine, ce qui entraîne un syndrome de choc toxique. Les infections des voies urinaires sont causées par *S. saprophiticus*, en particulier chez les femmes. Les agents pathogènes peu fréquents comprennent d'autres espèces de staphylocoques, telles que *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. schleiferi* et *S. intermedius*..(Foster, 1996)

2.Enterobactéries

Ces dernières années, les espèces d'Enterobacter sont devenues un agent pathogène important. La plupart de ces agents pathogènes sont naturellement résistants aux traitements antibactériens antérieurs et ont la capacité de développer rapidement une résistance aux nouveaux agents. L'utilisation des céphalosporines en milieu hospitalier a entraîné une augmentation des infections nosocomiales et l'émergence de souches multirésistantes. Les espèces d'Enterobacter, y

compris les souches multirésistantes, se sont récemment propagées dans la communauté, infectant occasionnellement des personnes en bonne santé. Ces organismes ont été associés à divers symptômes cliniques, souvent similaires à ceux causés par des agents pathogènes infectieux plus faciles à traiter, tels que les streptocoques du groupe A ou le *Staphylococcus aureus*.(Sanders et Sanders, 1997)

À ce jour, 22 espèces ont été trouvées dans le genre *Enterobacter* : *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* et *E. turicensis*. Le complexe *Enterobacter cloacae* comprend sept espèces : *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori* et *E. nimipressuralis*. Cette nomenclature repose sur le partage de caractères phénotypiques et, plus spécifiquement, génotypiques, établis par hybridation ADN-ADN du génome entier. En effet, le génome d'*E. cloacae* est identique à au moins 60 % à celui des six autres membres de ce groupe.(Hoffmann et Roggenkamp, 2003)

2.1.Définition

Enterobacter est un genre de bacilles anaérobies facultatifs à Gram négatif, mesurant 2 mm de long, mobiles et dotés de flagelles péritriches, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il a été décrit pour la première fois en 1960 par Hormaeche et Edwards.(Hormaeche & Edwards, 1960)

Enterobacter est présent dans une grande variété de milieux. Ces bactéries sont présentes dans le sol et l'eau et agissent comme endophytes ou phytopathogènes pour diverses espèces végétales.(Singh et al., 2018). De plus, les espèces d'*Enterobacter* sont des commensaux naturellement présents dans le microbiome intestinal animal et humain. Seul un sous-ensemble de ces micro-organismes a été associé à des maladies nosocomiales et à des épidémies.(Sanders et Sanders, 1997)

2.2.Classification

Enterobacter est un genre de bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, ordre *Enterobacterales*, classe *Gammaproteobacteria*, et au phylum des *Proteobacteria*.(Davin-Regli et Pagès, 2015)

2.3.Pouvoir pathogène et types d'infections

Certaines espèces de cette famille, *Enterobacteriaceae*, sont à l'origine de nombreuses infections humaines. Parmi celles-ci, on retrouve des infections urinaires (comme les cystites et les pyélonéphrites), des septicémies, des pneumonies, des infections digestives et hépatiques (telles que les péritonites et les cholangites), ainsi que des méningites.(Dortet et al., 2013)

Le genre *Enterobacter* regroupe des bactéries opportunistes capables de provoquer diverses infections nosocomiales, particulièrement chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés en soins intensifs. Leur pouvoir pathogène repose sur plusieurs facteurs de virulence moléculaires et mécanismes de résistance. Tout d'abord, la présence de lipopolysaccharides (LPS) dans leur membrane externe déclenche une réponse inflammatoire intense pouvant conduire à un choc septique.(Mavroidi et al., 2023)

certaines souches, notamment *E. cloacae*, expriment un système de sécrétion de type III, leur permettant d'injecter des protéines effectrices dans les cellules hôtes, facilitant ainsi l'invasion et la survie intracellulaire. De plus, elles possèdent des îlots de pathogénicité codant pour des sidérophores comme l'entérobactine, essentiels pour l'acquisition du fer dans l'environnement de l'hôte(Davin-Regli et al., 2019)

L'adhésion aux surfaces et la formation de biofilms sont assurées par des fimbriae, curli et pili de type IV, ce qui confère à ces bactéries une résistance accrue aux antibiotiques et au système immunitaire.(Mavroidi et al., 2023)

Concernant la résistance aux antibiotiques, les souches d'*Enterobacter* sont connues pour produire des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) comme CTX-M, SHV, ou TEM, qui hydrolysent une large gamme de pénicillines et céphalosporines.(Yeh et al., 2022)

En outre, des modifications structurales des porines membranaires et l'activation de pompes d'efflux réduisent davantage la perméabilité aux antibiotiques, renforçant la multirésistance.(Davin-Regli et al., 2019)

2.4.Manifestations cliniques

Enterobacter cloacae peut former des biofilms et contribuer à la sécrétion de multiples cytotoxines, telles que les entérotoxines, les hémolysines et les toxines formant des pores.(Davin-Regli et Pagès, 2015)

La production de biofilm par les souches uropathogènes d'*Escherichia coli* (UPEC) est un facteur de virulence impliqué dans l'étiologie de la prostatite aiguë. Cette capacité permet aux bactéries de persister dans le système sécrétoire prostatique, favorisant ainsi des infections durables. Bien que le biofilm ne soit pas directement impliqué dans l'invasion tissulaire, une propriété plutôt associée à l'hémolysine, il contribue à la survenue d'infections urinaires récurrentes, un tableau clinique typique de la prostatite bactérienne chronique.(Soto et al., 2007)

Infection urinaires nosocomiales persistantes : *Escherichia coli* productrice de biofilm est capable de coloniser les dispositifs médicaux comme les sondes urinaires, ce qui contribue à la persistance des infections urinaires contractées à l'hôpital. Le biofilm agit comme une barrière protectrice contre les forces hydrodynamiques, les défenses immunitaires de l'hôte et les antibiotiques, rendant l'éradication de l'infection difficile.(Soto et al., 2007)

Tolérance accrue aux antibiotiques et résistance à la phagocytose : Le biofilm confère à *E. coli* une meilleure survie face aux traitements antimicrobiens et une résistance significative aux mécanismes immunitaires, notamment la phagocytose, favorisant ainsi la chronicité de l'infection.(Soto et al., 2007)

2.5.Mode de transmission

Ces bactéries se transmettent facilement par contact direct (transmission manuportée) ou indirectement à travers l'eau ou des aliments contaminés. Cela facilite leur dissémination dans les communautés comme dans les établissements de soins. (Dortet et al., 2013)

Deuxième Partie: Partie expérimentale

Chapitre 3

Chapitre 3 : méthodologie

1. Préparation des milieux MacConkey

Pour le MacConkey Agar, une masse de 51,55 g de poudre déshydratée a été dissoute dans 1 litre d'eau distillée, conformément aux spécifications techniques du fournisseur qui préconise une concentration standard de 50,0 g/L. Le milieu a été chauffé jusqu'à dissolution complète, puis stérilisé par autoclave à 121 °C pendant 15 minutes (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, 2023b).

2. Préparation des milieux EMB

Quant au milieu EMB (Levine), 35,96 g de poudre ont été dissous dans 1 litre d'eau distillée également, suivant les recommandations précises du fabricant. Après homogénéisation complète, le milieu a été stérilisé dans les mêmes conditions que précédemment citées (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, 2023a).

Ces milieux ont été utilisés pour le repiquage des souches bactériennes en vue de leur purification et de leur identification ultérieure.

3. purification des souches d'*Enterobacter*

Dans le cadre de cette étude, des souches bactériennes présumées appartenir au genre *Enterobacter* ont été fournies par notre encadrante. Ces souches, issues d'échantillons alimentaires contaminés, étaient conservées dans des tubes contenant un milieu de conservation approprié, garantissant leur viabilité jusqu'à leur utilisation en laboratoire.

Pour isoler et purifier ces souches, une étape de repiquage a été réalisée sur deux milieux de culture sélectifs et différentiels : MacConkey agar et EMB (Eosin Methylene Blue) agar.

3.1. MacConkey agar

Le milieu MacConkey est conçu pour l'isolement des bactéries Gram négatif, en particulier les entérobactéries. Il contient des sels biliaires et du cristal violet qui inhibent la croissance des bactéries Gram positif, ainsi que du lactose et du rouge neutre pour différencier les bactéries fermentant le lactose de celles qui ne le fermentent pas. Les bactéries fermentant le lactose produisent des colonies roses à rouges, tandis que les non-fermentantes forment des colonies incolores ou translucides (Jung et Hoilat, 2025).

3.2. EMB agar

Le milieu EMB est également sélectif pour les bactéries Gram négatif et différentiel pour la fermentation du lactose. Il contient de l'éosine et du bleu de méthylène qui inhibent les bactéries Gram positif. Les bactéries fermentant le lactose, comme *Escherichia coli*, produisent des colonies avec un éclat métallique vert, tandis que d'autres, comme *Enterobacter*, forment des colonies muqueuses roses ou violettes sans éclat métallique(22.2, 2020) .

3.3. Procédure d'isolement

Les tubes de conservation ont été agités pour homogénéiser le contenu. À l'aide d'une anse stérile, une petite quantité de l'échantillon a été prélevée et ensemencée en stries sur les milieux MacConkey et EMB. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures .

4. Conservation des souches bactériennes pures

La procédure commence par le prélèvement d'une culture pure à l'aide d'une anse stérile en sélectionnant une colonie isolée de la souche à conserver. Ensuite, l'ensemencement est réalisé soit en piqûre, en introduisant l'anse au centre de la gélose, soit en surface, en étalant la souche sur la surface du milieu, selon les besoins expérimentaux. Après l'ensemencement, les tubes sont laissés à température ambiante(Microbiotech, s. d.) .

5. Identification biochimique système API 20 E

Après l'isolement et la purification des souches bactériennes sur gélose, celles-ci ont été soumises à une identification biochimique à l'aide du système API 20 E (bioMérieux), spécialement conçu pour l'identification des bacilles Gram négatif, en particulier ceux appartenant à la famille des Enterobacteriaceae.

Pour chaque souche, une suspension bactérienne a été préparée dans une solution stérile de chlorure de sodium (0,85 %) afin d'obtenir une turbidité standardisée, équivalente à celle de l'échelle McFarland (souvent 0,5). Cette suspension a ensuite été utilisée pour ensemencer les 20 cupules contenant différents substrats biochimiques sur la bandelette API, en suivant rigoureusement le protocole fourni par le fabricant. Certaines cupules ont été remplies jusqu'à ras bord et recouvertes d'huile minérale (notamment celles des tests nécessitant un environnement anaérobie, comme l'ADH, LDC et ODC).

Les galeries ainsi préparées ont été incubées à température ambiante (environ 25 °C) pendant 18 à 24 heures. À la fin de l'incubation, les réactions enzymatiques ont été observées par un changement de couleur dans les cupules, et certains tests ont nécessité l'ajout de réactifs spécifiques (par exemple : Kovac pour l'indole, réactif de Voges-Proskauer, etc.).

Les résultats obtenus ont été notés sous forme de profil numérique à neuf chiffres, permettant l'identification précise des espèces à l'aide de la base de données APIweb ou du catalogue fourni avec le kit (Aryal, 2019).

6. Test de mucoviscosité

Afin d'évaluer le caractère mucoïde des souches bactériennes, celles-ci ont été cultivées dans un bouillon LB sous agitation (220 rpm) pendant 24 heures à 37 °C. Un volume de 1 mL de chaque culture de nuit a été transféré dans des microtubes de 1,5 mL. L'absorbance à 600 nm (OD_{600}) a été mesurée avant centrifugation. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à $1000 \times g$ pendant 5 minutes, puis une deuxième mesure de l' OD_{600} a été effectuée après centrifugation (Beckman et al., 2024).

Le ratio de mucoviscosité est calculé selon la formule suivante :



7. Purification des souches de Staphylococcus :

Les souches présumées appartenant au genre *Staphylococcus* ont été purifiées à l'aide du milieu sélectif Chapman (Mannitol Salt Agar). Ce milieu est particulièrement adapté à l'isolement des staphylocoques, notamment *Staphylococcus aureus*, grâce à sa forte concentration en NaCl (7,5 %) qui inhibe la croissance de la majorité des autres bactéries, ainsi qu'à la présence de mannitol et du rouge de phénol comme indicateur de pH.

Un échantillon de chaque souche a été ensemencé en stries sur la gélose Chapman à l'aide d'une anse stérile, afin d'obtenir des colonies isolées. Les boîtes ont ensuite été incubées à température ambiante pendant 24 à 48 heures (*Chapman agar (Mannitol salt MSA)- Selective solid media for microbiology, s. d.*).

8. Préparation du milieu Rouge Congo (CRA) :

Le milieu CRA (Congo Red Agar) est utilisé pour l'évaluation de la capacité de production de biofilm chez certaines bactéries. Il s'agit d'un milieu différentiel basé sur la modification de la couleur et de la morphologie des colonies.

La préparation du milieu a été réalisée en ajoutant 0,8 g de rouge Congo et 36 g de saccharose à un litre de gélose Brain Heart Infusion (BHI) contenant 37 g/L. L'ensemble des composants a été dissous dans de l'eau distillée à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant. Une fois la dissolution complète assurée, le milieu a été stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes (Kirmusaoglu, 2019).

9. Détection de la formation de biofilm (méthode qualitative sur milieu Rouge Congo) :

Pour évaluer qualitativement la capacité des souches bactériennes à former un biofilm, un ensemencement a été réalisé sur le milieu Rouge Congo (CRA) préparé au préalable. Chaque souche bactérienne a été prélevée à l'aide d'une anse stérile et ensemencée en stries sur la surface du milieu CRA. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à température ambiante pendant 24 à 48 heures.

Après incubation, l'interprétation des résultats a été effectuée en fonction de l'aspect des colonies. Les souches formant un biofilm se caractérisent par des colonies noires, sèches et rugueuses, tandis que les souches non productrices de biofilm présentent des colonies lisses, rouges ou bordeaux, sans consistance muqueuse. Cette méthode permet donc une première évaluation visuelle de la capacité de formation de biofilm par les isolats testés (Freeman et al., 1989b).

10. Préparation du milieu TBS :

La préparation du milieu nutritif a été réalisée selon les instructions du fabricant (réf. BK046). Pour cela, 30,0 g de poudre déshydratée ont été dissous dans un litre d'eau distillée ou déminéralisée. La solution obtenue a été agitée lentement jusqu'à dissolution complète du milieu. Ensuite, le milieu a été réparti dans des flacons. La stérilisation a été effectuée à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 15 minutes afin d'assurer la stérilité du milieu avant son utilisation (« Trypto-caséine-soja (TSB) - Bouillon - BIODAR Diagnostics », s. d.).

11. Détection quantitative de la formation du biofilm par la méthode des microplaques

Afin d'évaluer la capacité de formation du biofilm des souches purifiées, la méthode des microplaques en polystyrène a été appliquée selon le protocole décrit par Nyenje et al. Les souches ont été cultivées dans des milieux TSB, puis incubées à deux températures différentes (25 °C et 37 °C) pendant deux durées d'incubation (24 h et 48 h), ce qui permet d'étudier l'effet de ces facteurs sur l'adhésion bactérienne.

Une suspension bactérienne normalisée à une turbidité équivalente à 0,5 McFarland a été préparée à partir de colonies isolées cultivées sur gélose nutritive. Ensuite, 20 µL de cette suspension ont été ajoutés à 180 µL de TSB dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits en U. Des puits témoins négatifs contenant uniquement le milieu ont été utilisés pour la comparaison. Après incubation, les puits ont été lavés trois fois avec une solution de PSB (phosphate buffered saline) pour éliminer les bactéries non adhérentes, puis laissés à sécher à température ambiante. Les biofilms formés ont été fixés par air chaud à 65 °C pendant 1 h, puis colorés avec 150 µL de violet de gentiane à 1 % pendant 30 minutes. L'excès de colorant a été éliminé par rinçage à l'eau courante, et les puits ont été laissés sécher avant d'ajouter 150 µL d'acide acétique glacé à 33 % pour solubiliser le colorant fixé. L'intensité de la coloration, reflétant la densité du biofilm, a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Nyenje et al., 2013b).

12. Traitement statistique des résultats : ANOVA factorielle

Afin d'analyser l'effet combiné de deux variables indépendantes — la température d'incubation (25 °C et 37 °C) et la durée d'incubation (24 h et 48 h) — sur la capacité de formation du biofilm (exprimée en densité optique), nous avons utilisé une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA à deux facteurs). Ce test statistique permet de déterminer si les effets principaux de chaque facteur, ainsi que leur interaction, ont une influence significative sur la variable dépendante. Cette approche est particulièrement adaptée aux expérimentations microbiologiques où plusieurs conditions sont croisées, comme dans le cas de la méthode Microtiter Plate Assay (Akbari et al., 2020 ; Field, 2013).

L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics, avec un seuil de signification fixé à $p < 0,05$, conformément aux recommandations en biostatistique appliquée.

Chapitre 4

Chapitre 4 : Résultats et Discussion

1. Purification d'isolats :

Après plusieurs repiquages successifs sur Maconkey et EMB, les souches ont montré une morphologie homogène, témoignant de leur pureté. (Figure 2)

Certaines souches ont présenté des difficultés de purification en raison de la croissance mixte persistante.

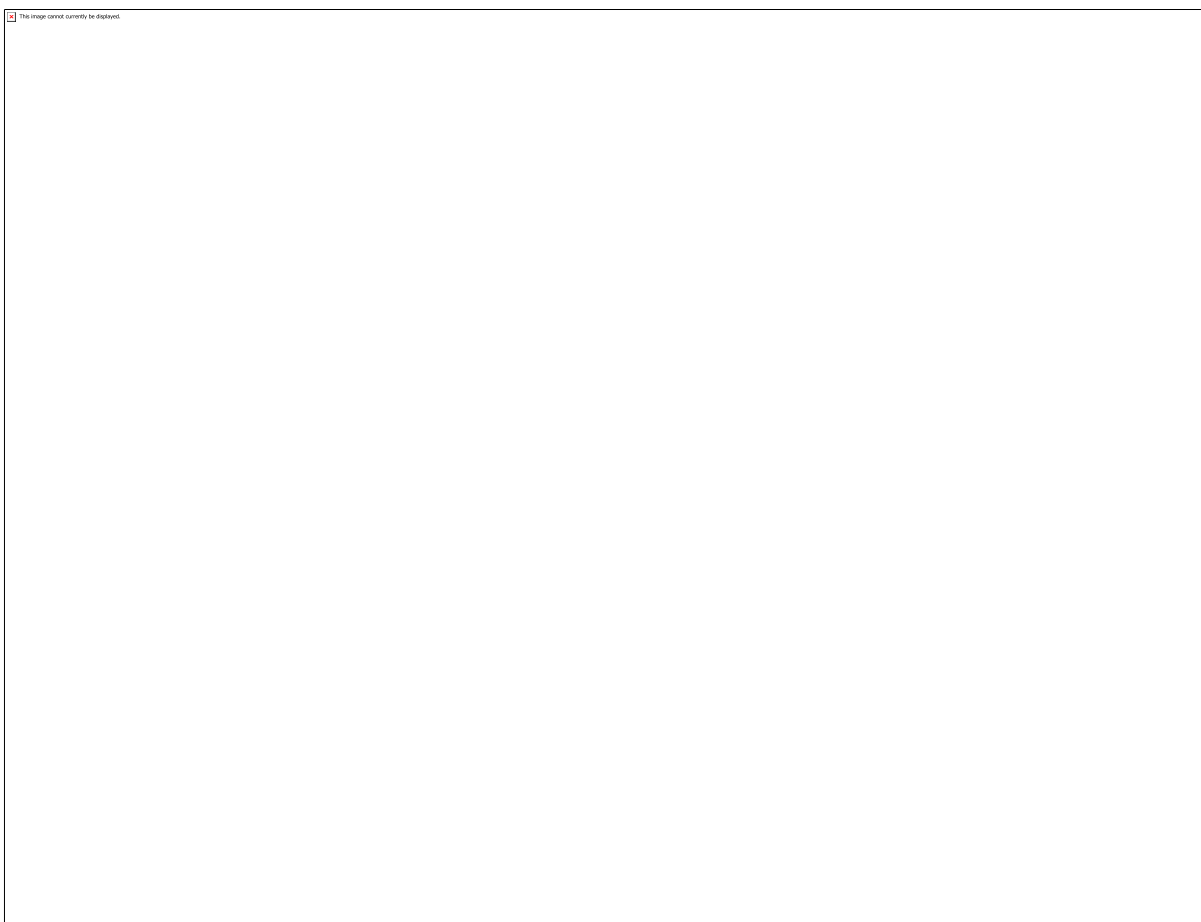


Figure 2. Aspect morphologique des colonies bactériennes après purification sur milieux sélectifs.

Les souches bactériennes étudiées ont été initialement reçues conservées dans un milieu de stockage, mais présentaient une contamination par un mélange de micro-organismes. Une étape de purification rigoureuse s'est donc avérée nécessaire afin d'obtenir des isolats purs et exploitables pour les analyses expérimentales ultérieures. Cette purification a été réalisée à l'aide de milieux

sélectifs et différentiels, adaptés à chaque type bactérien ciblé, notamment *Enterobacter* et *Staphylococcus* (Stepanović, Vuković, Hola, Di Bonaventura, et al., 2007a).

Les isolats du genre *Enterobacter* ont été cultivés sur les milieux MacConkey et EMB (Eosin Methylene Blue), tous deux conçus pour la différenciation des bacilles à Gram négatif, en particulier les entérobactéries. Le milieu MacConkey permet la sélection des bactéries capables de fermenter le lactose, qui apparaissent alors en rose, tandis que le milieu EMB met en évidence les colonies fortement acidifiantes par une coloration métallique caractéristique, facilitant ainsi le choix des colonies pures (Stepanović, Vuković, Hola, Di Bonaventura, et al., 2007a).

Quant aux isolats appartenant au genre *Staphylococcus*, ils ont été cultivés sur le milieu de Chapman (ou Mannitol Salt Agar), un milieu sélectif favorisant la croissance des cocci à Gram positif, particulièrement *Staphylococcus*. Ce milieu permet également de distinguer les espèces fermentant le mannitol, comme *S. aureus*, par un changement de couleur du milieu au jaune (Stepanović, Vuković, Hola, Di Bonaventura, et al., 2007a).

Cette étape de purification était essentielle pour garantir l'homogénéité des colonies sélectionnées et la fiabilité des résultats des tests ultérieurs, notamment les essais de formation de biofilm. La présence d'un mélange bactérien aurait pu fausser les observations et compromettre l'interprétation des données. Ainsi, la qualité de la purification constitue une étape critique dans tout protocole microbiologique rigoureux (Stepanović, Vuković, Hola, Di Bonaventura, et al., 2007a).

2. Identification biochimique par la galerie API 20E :

Après incubation à 37°C pendant 24 heures ont été interprétées visuellement selon la fiche d'identification fournie par bioMérieux. Chaque bandelette comprend 20 micro-tubes contenant des substrats spécifiques permettant l'identification des entérobactéries en fonction de la réaction enzymatique ou métabolique. Les résultats ont été lus visuellement en se basant sur le changement de couleur dans chaque micro-tubes, ce qui a permis de classer chaque test comme positif ou négatif. Sur la base des résultats obtenus, un profil biochimique spécifique a été généré pour chaque souche sous la forme d'un code numérique à 7 chiffres. Ces codes ont ensuite été introduits dans la plateforme en ligne pour l'interprétation automatique et l'identification probable des souches (bioMérieux, 2022).

Les couleurs observées dans les galeries API 20E révèlent une variété de profils biochimiques selon les souches testées. On note particulièrement des réactions positives aux sucres fermentescibles tels que le glucose (GLU), le mannose (MAN), le sorbitol (SOR) **et** le saccharose (SAC), indiquées par un virage net vers le jaune. En revanche, plusieurs tests enzymatiques comme la tryptophane désaminase (TDA), l'uréase (URE) **et** la production de sulfure d'hydrogène ($H_2 S$) montrent des résultats négatifs, traduits par l'absence de changement de couleur ou une coloration peu marquée. Certaines réactions, comme l'ornithine décarboxylase (ODC) ou le test de Voges-Proskauer (VP), se sont révélées variables d'une souche à une autre, jouant un rôle discriminant dans l'identification d'espèces bactériennes proches (figure 3).



Figure 3. Résultats visuels des galeries API 20E pour l'identification biochimique de certaines souches entérobactériennes.

L'identification biochimique par la galerie API 20E a permis de mettre en évidence une diversité bactérienne notable parmi les souches isolées. Les résultats montrent la présence majoritaire d'entérobactéries opportunistes telles que *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii*, ainsi que d'espèces pathogènes du genre *Salmonella*, identifiées avec une probabilité de 100 %. La détection de *Rahnella aquatilis*, une bactérie moins fréquente. L'analyse par le site a permis d'identifier les souches avec un pourcentage de probabilité élevé. Les résultats est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 1. Identification des entérobactéries par la galerie API 20^E.

Souche	Code API 20E	Identification	Probabilité (%)
Souche 1	3706573	<i>Salmonella spp.</i>	100 %
Souche 2	1024573	<i>Rahnella aquatilis</i>	100 %
Souche 3	1606573	<i>Salmonella spp.</i>	100 %
Souche 4	3305173	<i>Enterobacter sakazakii</i>	51.1 %
Souche 5	3205573	<i>Enterobacter cloacae</i>	93.1 %
Souche 6	3305573	<i>Enterobacter cloacae</i>	95,5 %
Souche 7	3604572	<i>Citrobacter freundii</i>	100 %

Ces espèces sont connues pour leur capacité à survivre dans des environnements humides et à s'adapter à diverses conditions physiques. Elles sont également parmi les espèces associées, selon des études antérieures, au phénomène de formation de biofilm, notamment dans les environnements alimentaires et aquatiques (*ABIS Encyclopedia*, s. d.).

En corrélant les résultats de l'identification avec ceux du test d'adhésion du biofilm (test en microplaque), il a été observé que ces cinq isolats présentaient une forte capacité d'adhésion à 25°C après 24 heures, ce qui indique que cette température est favorable au début de la formation du biofilm pour ces espèces. Cependant, cette capacité a diminué de manière significative après 48 heures à la même température, ce qui pourrait indiquer une phase de maturation ou une dégradation

partielle de la structure biologique due à des facteurs internes tels que l'accumulation de déchets métaboliques, un manque de nutriments, ou une dégradation de la matrice liée à un manque de stabilité structurelle (*ABIS Encyclopedia*, s. d.).

En revanche, ces isolats ont montré une faible adhésion à 37°C, aussi bien après 24 qu'après 48 heures, ce qui indique que ces espèces préfèrent des températures modérées (comme 25°C) pour s'implanter et construire leur matrice biologique, notamment dans des environnements abiotiques. Cette tendance pourrait être liée à l'origine de ces isolats, certains d'entre eux (comme *Rahnella aquatilis*) étant davantage associés à des environnements naturels et aquatiques froids (*ABIS Encyclopedia*, s. d.).

Et ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans l'étude (Kim et al., 2006) . *Enterobacter sakazakii* forme des biofilms plus efficacement à 25°C qu'à d'autres températures, particulièrement sur des surfaces abiotiques comme l'acier inoxydable

Citrobacter freundii peut former des biofilms à 25°C, bien que sa structure soit moins stable à 37°C (Ramos-Vivas et al., 2020).

Salmonella spp. produit un biofilm plus dense à des températures intermédiaires comme 25°C, bien que cela dépende de la souche (Stepanović et al., 2004).

Enfin, bien que *Enterobacter cloacae* soit souvent associée à la formation de biofilms en milieu hospitalier, sa capacité à le faire est également influencée par la température et les conditions de culture (Nyenje et al., 2013).

La corrélation entre température, durée d'incubation et capacité d'adhésion biofilmique met en évidence l'importance de ces facteurs dans l'expression de la virulence environnementale de ces bactéries. Cela souligne la nécessité d'adapter les conditions de détection du biofilm selon les contextes d'origine des souches (clinique, alimentaire, environnemental).

3. Test de Mucoviscosité :

Le test de mucoviscosité a révélé une variation notable entre les souches étudiées, bien qu'aucune n'ait atteint le seuil de 40% défini dans la littérature comme indicatif d'un phénotype hypermucoïde. La souche E7 a présenté la valeur la plus élevée avec 33,96%, ce qui la place dans la catégorie de mucoviscosité modérée à élevée, sans toutefois atteindre le niveau observé chez les

souches hypervirulentes. Les souches E7'C et K4 ont montré des taux de mucoviscosité de 14,65% et 13,02%, respectivement, des valeurs considérées comme faibles à modérées selon les seuils utilisés dans les études de référence. En revanche, Pseudo et E. coli ont présenté des pourcentages très bas (3,14% et 1,33%), suggérant une très faible production de capsule.(figure 4)

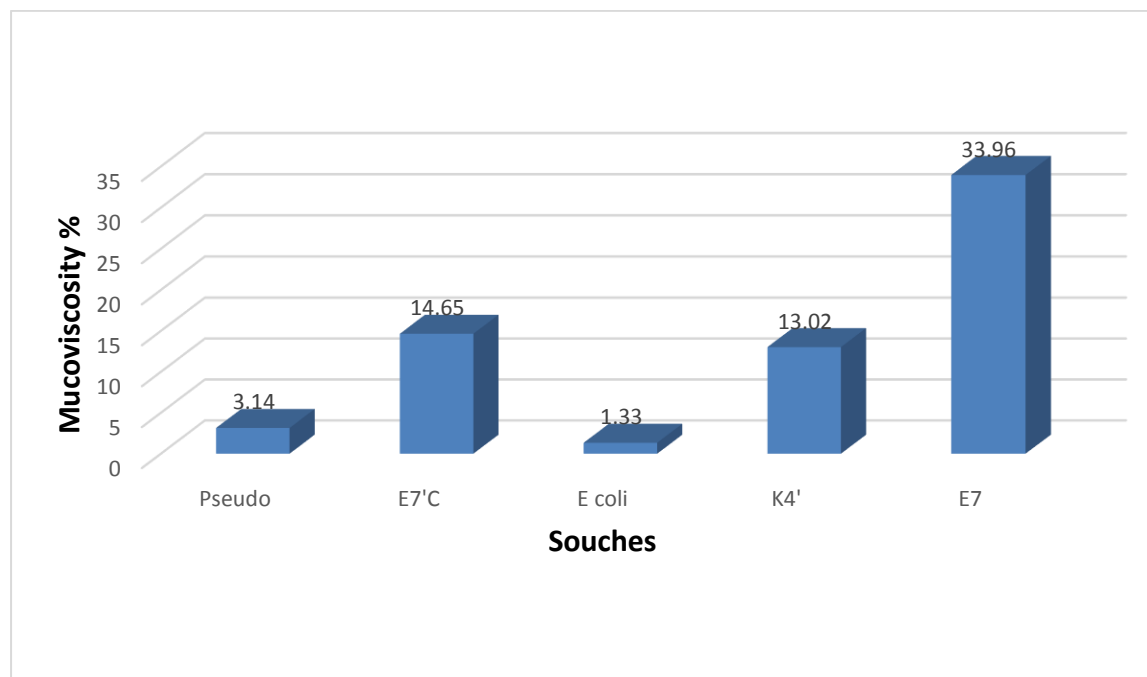


Figure 4.Évaluation comparative de la mucoviscosité (%) de différentes souches bactériennes.

Les résultats du test de mucoviscosité ont montré que tous les isolats bactériens analysés, y compris *Salmonella* spp. , *Rahnella aquatilis* , *Enterobacter sakazakii* , *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* , présentaient une faible mucoviscosité, ce qui indique une absence ou une production limitée de capsule externe riche en polysaccharides. Une viscosité élevée est généralement considérée comme un indicateur préliminaire de la présence de structures capsulaires impliquées dans la résistance aux stress environnementaux et la formation de biofilm.

Une faible mucoviscosité, traduisant l'absence ou la faible production de capsule riche en polysaccharides, est généralement associée à une capacité réduite de formation du biofilm, étant donné que la capsule joue souvent un rôle crucial dans l'adhésion initiale et la protection des cellules bactériennes. Cependant, dans certaines conditions, cette relation peut ne pas être strictement corrélé (Beckman et al., 2024).

Cependant, ce résultat semble partiellement contradictoire avec les résultats du test de microplaque (Microtiter plate assay), où les mêmes isolats ont montré une forte adhésion à 25°C après 24 heures d'incubation. Cela suggère que la formation de biofilm dans ces conditions ne dépend pas nécessairement de la présence d'une capsule visqueuse, mais pourrait plutôt être liée à d'autres facteurs comme la production d'exopolysaccharides (EPS) non capsulaires ou la présence de protéines de surface (adhésines) contribuant à l'adhésion initiale à la surface (Vu et al., 2009).

La diminution marquée de l'adhésion après 48 heures à la même température, ainsi que l'absence totale d'adhésion à 37°C, reflètent l'influence de la dynamique temporelle de la formation du biofilm par la température et la durée d'incubation, ce qui suggère que ces isolats peuvent être sensibles aux changements des conditions environnementales et préfèrent des températures modérées pour l'activité biologique liée à l'adhésion.

Ces résultats indiquent que le test de viscosité, bien que simple, ne reflète pas toujours la réelle capacité des bactéries à former un biofilm, surtout lorsque la capsule n'est pas l'élément central de la matrice biologique. Cela concorde avec ce que (Vu et al., 2009) ont rapporté, à savoir que la formation de biofilm est un processus multifactoriel pouvant être réalisé par des mécanismes alternatifs à la capsule .

4. Détection qualitative du biofilm par milieu Rouge congo :

Après 48 heures d'incubation, les résultats ont révélé que l'ensemble des souches (100 %) étaient négatives pour la production de biofilm, selon l'aspect des colonies observées sur le milieu Rouge congo. Parmi elles, 37 souches (80,43 %) étaient des Staphylocoques et 9 souches (19,56 %) des Entérobactéries. La majorité des souches (32,61 %) ont produit des colonies de couleur bordeaux (rouge foncé), souvent associées à une production très faible voire nulle de slime . Une proportion importante (26,09 %) a montré des colonies rouges avec des centres ou des bords roses, également caractérisées comme non productrices de biofilm. Les autres souches affichaient des teintes rouges, roses ou roses pâles, qui selon la classification de référence, correspondent toutes à des souches non productrices de slime. (Tableau 2)

Tableau 2. Répartition des souches selon la couleur des colonies sur milieu CRA et leur interprétation selon (Arciola et al., 2002).

Couleur observée	Nombre de souches	Pourcentage (%)	Interprétation	Résultat
Bordeaux (rouge foncé)	15	32,61 %	Production très faible ou nulle	–
Rouge	4	8,70 %	Non producteur	–
Rouge avec rose	12	26,09 %	Non producteur	–
Rose	6	13,04 %	Non producteur	–
Rose pâle	6	13,04 %	Non producteur	–

On y remarque une diversité de colorations allant du bordeaux, rouge, rose ainsi que des variations de texture (colonies lisses, rugueuses ou sèches). (Figure 5)

Aucune colonie n'a présenté de coloration noire, signe caractéristique de la production de slime associée à la formation de biofilm, selon les critères décrits par Arciola et al. (2002).

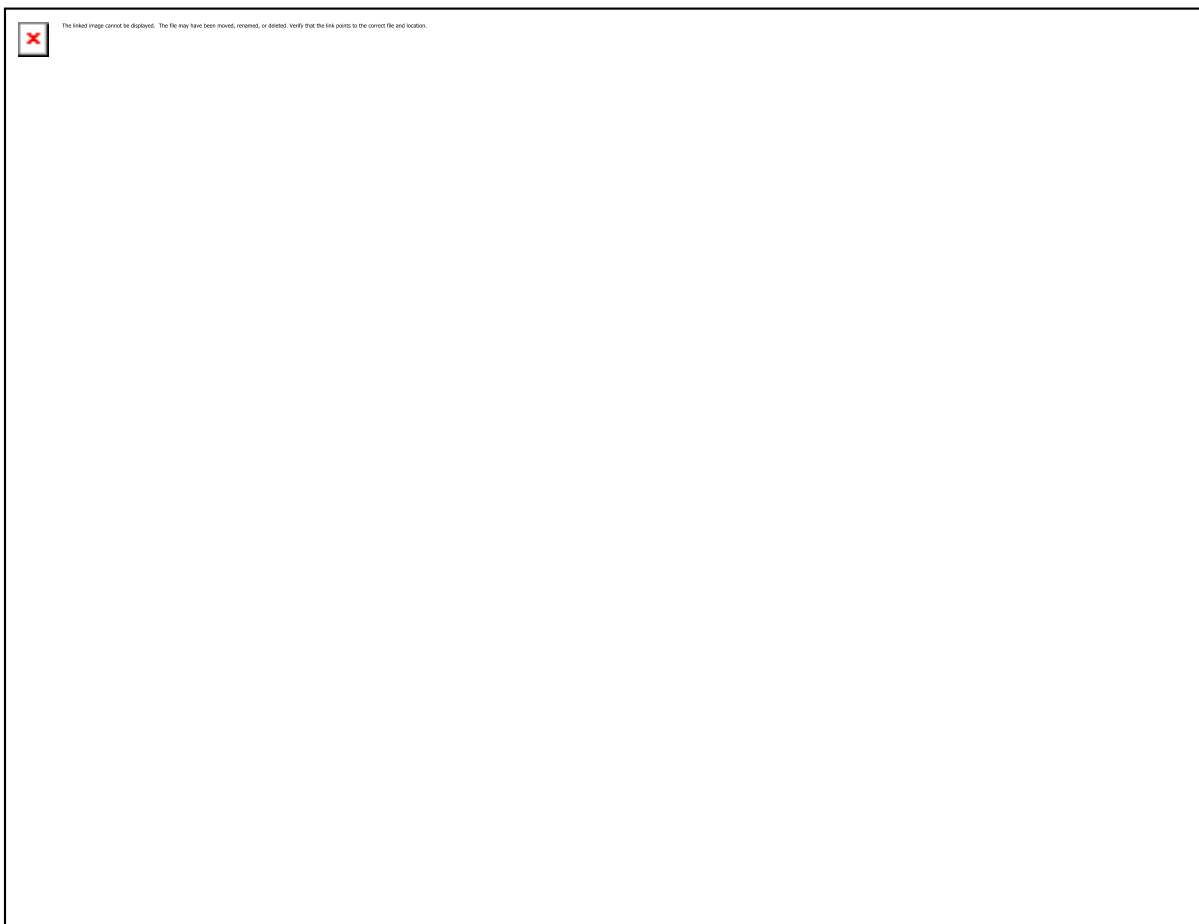


Figure 5. Exemples typiques de colonies de différentes couleurs observées sur milieu CRA après 48 heures d'incubation.

Le milieu Congo Red Agar (CRA) est une méthode qualitative utilisée pour évaluer la capacité des bactéries à produire des exopolysaccharides (EPS), qui constituent l'un des éléments essentiels dans la structure du biofilm. Dans ce travail, ce test a été réalisé sur différents isolats bactériens afin d'évaluer leur aptitude à produire les composés associés à la matrice du biofilm.

Les résultats ont montré que la plupart des isolats ont donné des colonies de couleur rouge, rose ou bordeaux, ce qui indique une absence ou une faible production d'EPS dans les conditions de culture adoptées, et par conséquent, une incapacité à former un biofilm ou une formation très limitée. Une coloration rouge claire est généralement considérée comme un indicateur négatif dans ce type de test, suggérant que les bactéries n'ont pas produit la couche muqueuse (slime layer) nécessaire à la formation de la matrice du biofilm.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de (Freeman et al., 1989c), qui a montré que les isolats capables de produire un biofilm génèrent des colonies de couleur noire ou foncée en raison

de l'interaction des exopolysaccharides avec le colorant Congo Red, tandis que les isolats incapables de le faire produisent des colonies plus claires telles que rose ou rouge.

De plus, le test qualitatif à lui seul ne permet pas de déterminer le degré de formation biofilmique ; c'est pourquoi ces résultats ont été complétés par un test quantitatif du biofilm, permettant une mesure plus précise de la fixation des cellules bactériennes sur les surfaces.

5. Test quantitatif de formation du biofilm (Microtiter Plate Assay) :

Le test Microtiter Plate Assay a été adopté pour évaluer de manière quantitative la capacité des isolats bactériens à former un biofilm, en mesurant la densité cellulaire fixée à la surface à l'aide de la coloration au cristal violet, sous quatre conditions d'incubation différentes (deux températures et deux durées d'incubation).

À l'aide d'un lecteur de microplaques, la densité optique (DO) de chaque puits coloré au cristal violet est déterminée à 595 nm.

Le problème courant des lecteurs de DO est qu'ils ne mesurent la DO qu'en un seul point au milieu du puits. Par conséquent, la mesure sera imprécise si l'épaisseur du biofilm à cet endroit diffère sensiblement de celle du reste du puits. Cependant, le protocole suggéré permet une resolubilisation homogène du colorant fixé aux cellules bactériennes dans la couche de biofilm, ce qui permet une évaluation indirecte mais précise du développement du biofilm. (Stepanović, et al., 2007)

Les tests ont été réalisés trois fois en triple, l'interprétation des résultats obtenus nécessite de déterminer la moyenne des résultats et des écarts types . Le seuil a été fixé à trois écarts types au-dessus de la DO moyenne du témoin négatif (DOc), qui comprenait uniquement le bouillon. Les critères suivants ont été utilisés pour catégoriser les différentes forces d'adhérence :

- $DO < ODC =$ non adhérent
- $ODC < DO \leq (2 \times ODC) =$ faiblement adhérent
- $(2 \times ODC) < DO \leq (4 \times ODC) =$ modérément adhérent
- $(4 \times ODC) < DO =$ fermement adhérent. (Nyenje et al., 2013c)

Les isolats d'Entérobactéries et Staphylocoques ont présenté quatre phénotypes de biofilm différents (non adhérents(NA), faiblement adhérents(WA), modérément adhérents(MA) et fortement adhérents(SA) après 24 heures d'incubation dans TSB (Tableau 3). La densité optique (DO) obtenues pour les phénotypes variait entre :

Non adhérents(NA) : 0.107 à 0.927, Faiblement adhérentes (WA) : 0.143 à 0.771, Modérément adhérentes (MA) : 0.284 à 1.720, Fortement adhérentes (SA) : 0.525 à 2.366. (Tableau 4).

À 25°C pendant 24 heures, la totalité des souches (100 %) ont montré une capacité d'adhésion, avec une prédominance des souches fortement adhérentes (43 %) et modérément adhérentes (39 %), alors que seulement 17 % étaient faiblement adhérentes et aucune souche n'était non adhérente. Cette condition s'est avérée la plus favorable à la formation du biofilm (Figure 8). Cette observation est appuyée statistiquement par la moyenne de la densité optique observée dans cette condition, qui atteint 0,634 ($\pm 0,053$) – la valeur la plus élevée de toutes les conditions testées.

L'analyse de la variance (ANOVA à deux facteurs) confirme cette différence, avec un effet significatif de la température sur la densité optique ($F(1,180) = 8,090$; $p = 0,005$). Cette température modérée semble stimuler l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la matrice extracellulaire du biofilm, favorisant ainsi une adhésion initiale robuste (Stepanović et al., 2007).

En revanche, lorsque la durée d'incubation à 25°C est prolongée à 48 heures, une baisse marquée de l'adhésion est observée, avec une chute de la densité optique moyenne à 0,460 ($\pm 0,034$) et un pourcentage élevé de souches non adhérentes (63 %) (Figure 9). Bien que l'effet de la durée seule n'ait pas atteint le seuil de signification ($F(1,180) = 2,145$; $p = 0,145$), l'analyse montre une tendance à la diminution de l'adhésion avec le temps, ce qui pourrait être lié à des mécanismes naturels de dispersion du biofilm, activés par les signaux de stress ou la limitation des nutriments (Davies et al., 1998 ; Kaplan, 2010).

À 37°C pendant 24 heures, les capacités d'adhésion sont encore plus faibles, avec une densité optique moyenne de 0,383 ($\pm 0,056$). Seules 40 % des souches sont adhérentes, dont une minorité avec une forte ou moyenne adhésion (Figure 10). La température plus élevée semble agir comme un facteur de stress inhibant les voies de signalisation nécessaires à la formation du biofilm (Poole,

2012). Cette différence est appuyée par l'analyse des comparaisons appariées, où la comparaison entre 25°C et 37°C est hautement significative ($p = 0,005$).

Lorsque la température de 37°C est combinée avec 48 heures d'incubation, la densité optique chute encore à 0,393 ($\pm 0,056$), et 100 % des souches deviennent non adhérentes, traduisant une inhibition quasi complète du processus (Figure 7).

Par ailleurs, l'interaction entre la température et la durée d'incubation, bien qu'elle n'ait pas atteint la signification statistique ($F(1,180) = 2,705$; $p = 0,102$), révèle tout de même des tendances biologiques pertinentes. Le croisement des données montre que la combinaison 25°C / 24h est de loin la plus efficace pour la formation du biofilm, alors que 37°C / 48h est associée à une absence quasi totale d'adhésion. Ces différences sont visuellement représentées dans la figure 7, qui illustre l'effet combiné des deux facteurs sur la densité optique. Cela confirme que même en l'absence de signification statistique stricte, les conditions environnementales interagissent de manière complexe pour moduler l'expression des phénotypes biofilm.

En résumé, les résultats démontrent que la température a un effet significatif sur la formation du biofilm, tandis que la durée d'incubation exerce une influence modérée, et que l'interaction entre ces deux facteurs, bien que non significative statistiquement, reste biologiquement significative. La figure 7 et le tableau 3 illustrent clairement que la condition 25°C / 24h est optimale pour la formation du biofilm. Ces résultats sont cohérents avec la littérature scientifique, notamment les travaux de Donlan (2002), qui soulignent l'importance des conditions environnementales dans le développement des biofilms bactériens.

Tableau 3. Les effets de la température, du temps d'incubation sur la formation de biofilm des isolats d'Entérobactéries et Staphylocoques.
TSB : Tryptic Soy Broth, MA : Moderately Adherent, NA : Non-Adherent, WA : Weak Adherent, SA : Strongly Adherent.

Phénotype du Biofilm	Nombre de paramètres (%)			
	TSB			
	24 h		48 h	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
NA	0	27(58)	29(63)	46(100)

Phénotype du Biofilm	Nombre de paramètres (%)			
	TSB			
	24 h		48 h	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
WA	8(17)	11(23)	12(26)	0
MA	18(39)	4(8)	5(10)	0
SA	20(43)	4(8)	0	0
Taux d'adhérence (%)	46 (100)	19 (40)	17 (36)	0 (0)

Il est clairement observé que les souches incubées à 37°C pendant 24 h présentent des valeurs DO élevées dans la gamme des phénotypes fortement adhérents (1.021–1.711), indiquant une capacité importante à former un biofilm sous ces conditions. À 25°C pendant 24 h, la gamme DO correspondant aux biofilms forts est plus large (0.525–2.366), ce qui suggère une variabilité plus importante entre les souches en termes de pouvoir adhésif.

En revanche, à 25°C pendant 48 heures, aucune souche fortement adhérente n'a été détectée, ce qui pourrait indiquer que cette condition d'incubation n'est pas optimale pour l'induction d'un biofilm mature et structuré, probablement en raison de l'épuisement des nutriments, de l'accumulation de produits métaboliques toxiques ou encore du début de la dégradation de la matrice biofilmique (EPS) comme le suggère (Bridier et al., 2011).

Globalement, on remarque que la température 25°C favorise la formation du biofilm, notamment après 24 heures d'incubation, ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle la température constitue un facteur environnemental clé influençant la production de biofilm chez les souches étudiées.(Tableau 4).

**Tableau 4. Les densités optiques moyennes des différents phénotypes de biofilm.
DO : densité optique, ND : non détecté**

paramètres	Formation de biofilm			
	Non adhérent	Faiblement adhérent	Modérément adhérent	Fortement adhérent
	Gamme DO	Gamme DO	Gamme DO	Gamme DO
25 °C (24 h)	ND	0.143-0.233	0.284-0.480	0.525-2.366
25 °C (48 h)	0.107-0.425	0.451-0.771	0.967-1.720	ND
37 °C (24 h)	0.147-0.249	0.258-0.496	0.611-0.959	1.021-1.711
37 °C (48 h)	0.168-0.927	ND	ND	ND

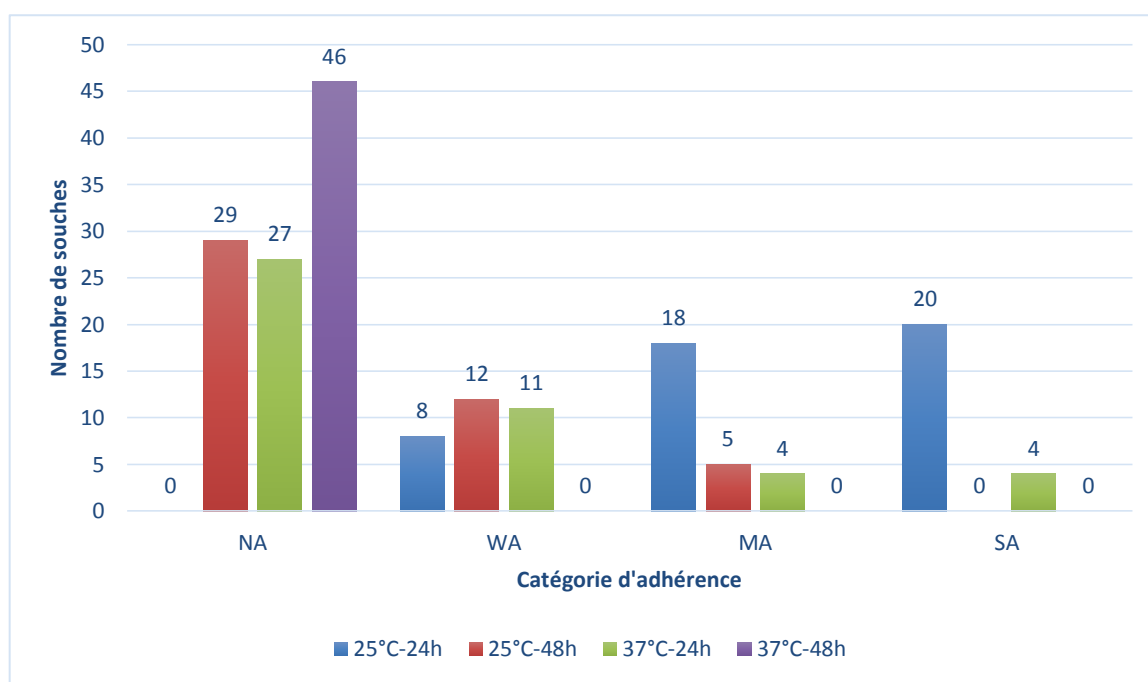


Figure 6. Histogramme de Répartition des souches d'Entérobactéries et Staphylocoques selon leur capacité d'adhésion dans différentes conditions d'incubation.

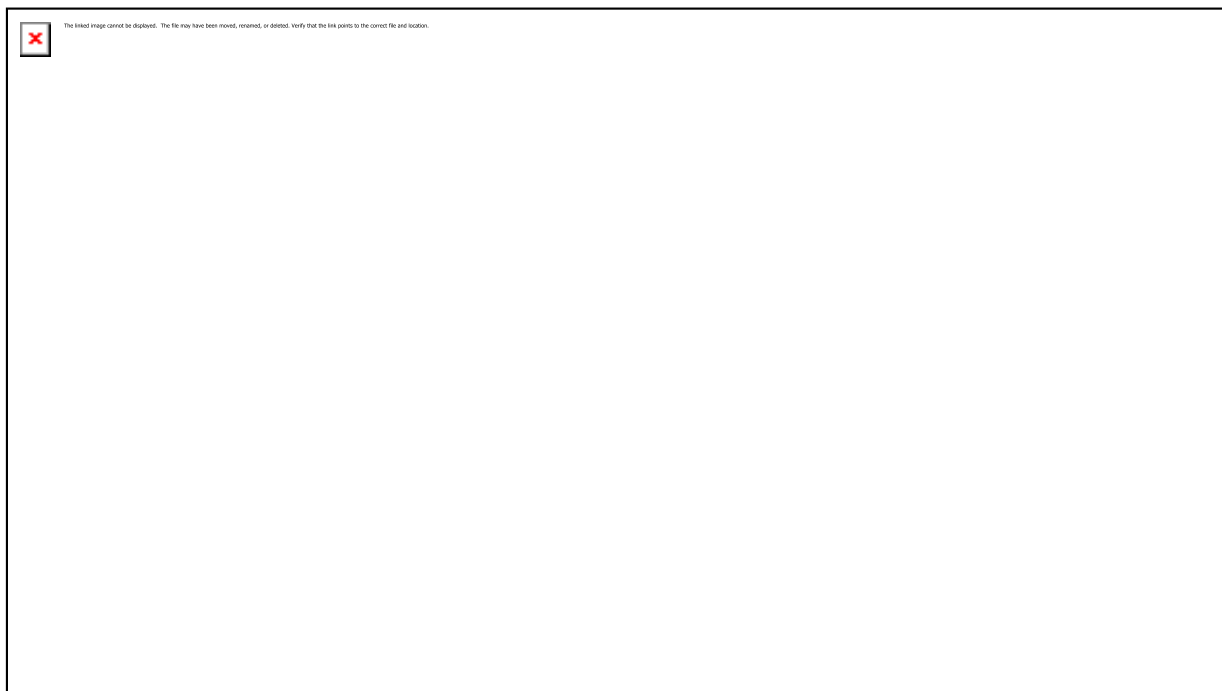


Figure 7 : Effet combiné de la température et la durée d'incubation sur la densité optique mesurant la formation du biofilm.

5.1.Implications pratiques et cliniques

Les résultats obtenus présentent des implications concrètes dans plusieurs domaines :

Dans le secteur médical, comprendre que les souches bactériennes forment mieux le biofilm à 25°C peut orienter les pratiques de désinfection des équipements hospitaliers, notamment ceux exposés à température ambiante (comme les cathéters, surfaces en inox, sondes). Les biofilms formés à cette température peuvent échapper au traitement antibiotique, posant un risque d'infection persistante (Hall-Stoodley et al., 2004).

Dans l'industrie agroalimentaire, ces données montrent qu'une surveillance rigoureuse des températures de stockage est cruciale. Un entreposage prolongé à température ambiante (environ 25°C) pourrait favoriser la colonisation des surfaces par des biofilms de pathogènes comme *Enterobacter* ou *Staphylococcus*, compromettant ainsi la sécurité microbiologique des produits (Chmielewski & Frank, 2003).

Ainsi, ces résultats renforcent l'importance de maîtriser les conditions environnementales pour prévenir la formation et la persistance des biofilms bactériens dans les milieux sensibles.

6. Les limites de l'étude

L'étude présente certaines limitations méthodologiques et expérimentales qui méritent d'être soulignées :

Conditions d'incubation restreintes : seules deux températures (25°C et 37°C) et deux durées d'incubation (24 h et 48 h) ont été testées. L'absence d'évaluation à des températures plus extrêmes, comme 4°C (conditions de réfrigération) ou 42°C (stress thermique), limite la portée des conclusions sur l'adaptabilité des souches.

Approche exclusivement phénotypique : Deux méthodes ont été utilisées dans cette étude, à savoir le test sur gélose Congo Red Agar (CRA) et l'essai sur microplaque (Microtiter Plate Assay). Plusieurs souches ont présenté une forte adhésion dans le test sur microplaque à 25 °C après 24 heures, alors qu'aucune d'entre elles n'a montré une production visible de biofilm sur le milieu CRA. Ce décalage peut s'expliquer par la différence de sensibilité entre les deux approches : le test CRA étant moins sensible, notamment vis-à-vis des biofilms faiblement producteurs d'exopolysaccharides ou de certaines structures biofilmiques (Basnet et al., 2023). Cette divergence met en évidence l'importance de recourir à des méthodes complémentaires afin d'obtenir une évaluation plus fiable. Par ailleurs, l'absence de techniques moléculaires telles que la PCR ou la RT-qPCR limite la confirmation de la présence des gènes impliqués dans la formation du biofilm.

Facteurs externes non explorés : l'étude n'a pas inclus l'impact de facteurs environnementaux tels que les antibiotiques, les agents désinfectants ou les variations du pH, alors que ces éléments influencent fortement la formation et la stabilité des biofilms dans des contextes réels (hôpitaux, industrie agroalimentaire...).

7. Perspectives

Pour pallier ces limites et approfondir les connaissances sur la formation des biofilms, plusieurs axes de recherche sont envisagés :

Élargissement du panel d'isolats : inclure un plus grand nombre de souches issues de diverses origines (environnementales, alimentaires, cliniques) pour obtenir une vision plus représentative des capacités biofilmogènes bactériennes.

Intégration des approches moléculaires : recourir à des techniques comme la PCR ou la RT-qPCR pour détecter les gènes liés à la formation du biofilm (tels que *icaA*, *bap*, *fimH*, *csgD*), et ainsi valider les observations phénotypiques par une preuve génétique.

Étude de l'impact des antimicrobiens : tester l'effet d'antibiotiques ou de composés inhibiteurs sur la formation du biofilm, afin de proposer des stratégies de lutte plus efficaces, notamment dans le domaine médical et agroalimentaire.

Analyse morphologique approfondie : observer la structure du biofilm à l'aide de techniques d'imagerie avancées telles que la microscopie électronique à balayage (SEM) ou la microscopie confocale à balayage laser (CLSM), pour mieux comprendre l'architecture tridimensionnelle du biofilm.

Étude des biofilms mixtes : explorer les interactions entre différentes espèces bactériennes dans la formation de biofilms multispecies, particulièrement dans les environnements complexes comme les surfaces alimentaires ou les dispositifs médicaux.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude met en évidence de manière claire l'influence déterminante de la température et du temps d'incubation sur la capacité des souches bactériennes à former un biofilm. Si la formation de biofilm est souvent considérée comme un caractère stable et intrinsèque à certaines espèces pathogènes, nos observations soulignent au contraire son caractère modulable, fortement dépendant des conditions environnementales.

La méthode qualitative CRA, bien que largement utilisée pour une première évaluation, s'est révélée ici peu sensible. Aucune souche n'a produit de coloration noire indicative d'un biofilm mature. Cela pourrait être interprété, non pas comme une incapacité totale à former un biofilm, mais plutôt comme une limitation de la méthode à détecter certaines phases précoces ou des niveaux faibles de production de la matrice extracellulaire. En revanche, la méthode de microplaque, plus fine et quantitative, a permis de révéler des profils d'adhérence variables selon les conditions testées, traduisant un comportement adaptatif des souches face à leur environnement.

Le pic d'adhérence observé à 25°C pendant 24 heures, avec un taux de biofilm de 100%, suggère que des températures inférieures à la température corporelle peuvent favoriser l'initiation du biofilm. Ce constat est particulièrement pertinent dans les contextes extrahospitaliers ou environnementaux, où ces conditions sont fréquemment rencontrées. À l'inverse, la diminution progressive de l'adhérence à 48h et à 37°C pourrait indiquer une régulation négative du biofilm ou une entrée en phase de dispersion, soulignant le caractère dynamique de ce phénomène.

Au-delà des aspects expérimentaux, cette étude présente une valeur pratique importante. En identifiant les conditions qui favorisent la formation du biofilm, nos résultats peuvent contribuer à améliorer les stratégies de prévention dans les secteurs sensibles tels que le domaine hospitalier ou l'industrie agroalimentaire. Adapter les protocoles de désinfection en fonction des conditions environnementales identifiées pourrait aider à limiter l'implantation et la persistance des biofilms, souvent résistants aux traitements classiques.

En conclusion, cette étude apporte des éléments concrets sur la capacité d'adaptation des Staphylocoques et des Entérobactéries face à leur environnement et ouvre la voie à des perspectives de recherche plus approfondies, associant analyses moléculaires, essais en conditions réelles et exploration ciblée des facteurs de virulence liés au biofilm.

Références bibliographique

Références

- Arciola, C. R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2002). Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Molecular Diagnostic*, 2(5), 478-484.
- 22.2 : Selective and Differential Media - MacConkey, EMB, MSA. (2020, septembre 24). *Biology LibreTexts*.
- *ABIS Encyclopedia*. (s. d.). Consulté 22 mai 2025, à l'adresse https://www.tgw1916.net/Enterobacteria/rahnella_aquaticus.html
- Akbari, R., Asadikaram, G., Sayadi, M. H., & Masoudinejad, R. (2020). Evaluation of biofilm formation in relation to temperature and incubation time in *Pseudomonas* strains isolated from wastewater. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1375–1384. <https://doi.org/10.1111/jam.14509>
- AO Research Institute, Clavadelerstrasse, CH 7270 Davos, Switzerland, Harris, L., Foster, S., & Richards, R. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials : Review. *European Cells and Materials*, 4, 39-60. <https://doi.org/10.22203/eCM.v004a04>
- Aryal, S. (2019, avril 12). API (Analytical Profile Index) 20E Test—Procedure, Uses and Interpretation. *Microbiology Info.Com*. <https://microbiologyinfo.com/api-20e-test/>
- Basnet, A. Tamang, B. Shrestha, M. Shrestha, L. Rai, J. Maharjan, R. Dahal, S. Shrestha, P. (2023). Assessment of four in vitro phenotypic biofilm detection methods in relation to antimicrobial resistance in aerobic clinical bacterial isolates. *PLOS ONE*, 18(11), 294-646

- 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*(1), 151. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00629-y>
- biomérieux. API 20^E: Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods - User manual. Marcy-l'étoile, France: biomérieux
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants : A review. *Biofouling*, *27*(9), 1017-1032. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>
- Capita, R., Castaño-Arriba, A., Rodríguez-Melcón, C., Igrejas, G., Poeta, P., & Alonso-Calleja, C. (2020). Diversity, Antibiotic Resistance, and Biofilm-Forming Ability of Enterobacteria Isolated from Red Meat and Poultry Preparations. *Microorganisms*, *8*(8), 1226. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081226>
- *Chapman agar (Mannitol salt MSA)- Selective solid media for microbiology*. (s. d.). Consulté 19 mai 2025, à l'adresse <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-chapman-agar-mannitol-salt-msa-5521.html>
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *2*(1), 22–32
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, *41*, 435-464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, *49*, 711-745.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms : A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, *284*(5418), 1318-1322.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, *280*(5361), 295–298.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.-P., & Pagès, J.-M. (2019). *Enterobacter* spp. : Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(4), e00002-19. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-19>
- Davin-Regli, A., & Pagès, J.-M. (2015). Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms : Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, *8*(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002a). Biofilms : Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(2), 167-193.
<https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002b). Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*.
<https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>

- Dortet, L. Poirel, L. Nordmann, P. Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmes. (2013). *feuillet de Biologie*.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms : An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Foster, T. (1996). Staphylococcus. In S. Baron (Éd.), *Medical Microbiology* (4th éd.). University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989a). 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>
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989b). 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>
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989c). 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>
- Field, A. (2013). *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics* (4th ed.). SAGE Publications.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms : From the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>

- HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (2023a). *EMB Agar (Levine)—Technical Data Sheet* (Mumbai, India). HiMedia Laboratories.
- HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (2023b). *MacConkey Agar—Technical Data Sheet* (Mumbai, India). HiMedia Laboratories.
<https://www.himedialabs.com/media/TD/M081.pdf>
- Hoffmann, H., & Roggenkamp, A. (2003). Population Genetics of the Nomenclotype *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5306-5318.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003>
- Hormaeche, E., & Edwards, P. R. (1960). A Proposed Genus *Enterobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 10(2), 71-74.
<https://doi.org/10.1099/0096266X-10-2-71>
- Jung, B., & Hoilat, G. J. (2025). MacConkey Medium. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal : Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205-218.
<https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Kim, H., Ryu, J.-H., & Beuchat, L. R. (2006). Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5846-5856. <https://doi.org/10.1128/AEM.00654-06>
- Kırmusaoğlu, S. (2019). The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. In *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84411>

- Kloos WE, Schleifer KH (1986) Genus 4 - Staphylococcus Rosenbach 1884. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, eds. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, vol 2. Williams and Wilkins, Baltimore
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., & Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*.
<https://doi.org/10.1128/jb.173.20.6558-6567.1991>
- Lyon, B. R., & Skurray, R. (1987). Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus : Genetic basis. *Microbiological Reviews*, 51(1), 88-134.
<https://doi.org/10.1128/mr.51.1.88-134.1987>
- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34-39. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2)
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci : An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(1), 25-29. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.19890>
- Mavroidi, A., Gartzonika, K., Spanakis, N., Froukala, E., Kittas, C., Vrioni, G., & Tsakris, A. (2023). Comprehensive Analysis of Virulence Determinants and Genomic Islands of blaNDM-1-Producing Enterobacter hormaechei Clinical Isolates from Greece. *Antibiotics*, 12(10), 1549. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101549>
- Microbiotech. (s. d.). Gélose de conservation et de transport. *La Boutique en ligne*. Consulté 19 mai 2025, à l'adresse <https://store.microbiotech.dz/index.php/produit/gelose-de-conservation-et-de-transport/>

- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Nyenje, M. E., Green, E., & Ndip, R. N. (2013a). 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 (Basel, Switzerland)*, 18(8), 9582-9593. <https://doi.org/10.3390/molecules18089582>
- Nyenje, M. E., Green, E., & Ndip, R. N. (2013b). 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 (Basel, Switzerland)*, 18(8), 9582-9593. <https://doi.org/10.3390/molecules18089582>
- Nyenje, M. E., Green, E., & Ndip, R. N. (2013c). 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), Article 8. <https://doi.org/10.3390/molecules18089582>
- Otto, M. (2018). Staphylococcal Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>
- Poole, K. (2012). Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2069–2089.
- Ramos-Vivas, J., Chapartegui-González, I., Fernández-Martínez, M., González-Rico, C., Barrett, J., Fortún, J., Escudero, R., Marco, F., Linares, L., Nieto, J., Aranzamendi, M., Muñoz, P., Valerio, M., Aguado, J. M., Chaves, F., Gracia-Ahufinger, I., Paez-Vega, A., Martínez-Martínez, L., & Fariñas, M. C. (2020). Adherence to Human Colon Cells by Multidrug Resistant *Enterobacteriales* Strains Isolated From Solid Organ Transplant

Recipients With a Focus on *Citrobacter freundii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 447. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00447>

- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm : Formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701-1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Sanders, W. E., & Sanders, C. C. (1997). Enterobacter spp. : Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(2), 220-241. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.2.220>
- Singh, N. K., Bezdán, D., Chęcinska Sielaff, A., Wheeler, K., Mason, C. E., & Venkateswaran, K. (2018). Multi-drug resistant Enterobacter bugandensis species isolated from the International Space Station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains. *BMC Microbiology*, 18(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1325-2>
- Soto, S. M., Smithson, A., Martinez, J. A., Horcajada, J. P., Mensa, J., & Vila, J. (2007). Biofilm Formation in Uropathogenic Escherichia coli Strains : Relationship With Prostatitis, Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance. *The Journal of Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.08.081>
- Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L., & Svabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by Salmonella spp. And Listeria monocytogenes on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428-432. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.

Journal of Microbiological Methods, 40(2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)

- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates : Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007a). Quantification of biofilm in microtiter plates : Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 115(8), 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007b). Quantification of biofilm in microtiter plates : Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 115(8), 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 199-210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>

- Trypto-caséine-soja (TSB)—Bouillon—BIOKAR Diagnostics. (s. d.). *BIOKAR Diagnostics*. Consulté 19 mai 2025, à l'adresse <https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/produit/trypto-caseine-soja-tsb-bouillon/>
- Vani, S., Vadakkan, K., & Mani, B. (2023). A narrative review on bacterial biofilm : Its formation, clinical aspects and inhibition strategies. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s43094-023-00499-9>
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(7), 2535-2554. <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>
- Yeh, T.-K., Lin, H.-J., Liu, P.-Y., Wang, J.-H., & Hsueh, P.-R. (2022). Antibiotic resistance in *Enterobacter hormaechei*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 60(4), 106650. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106650>

Annexes

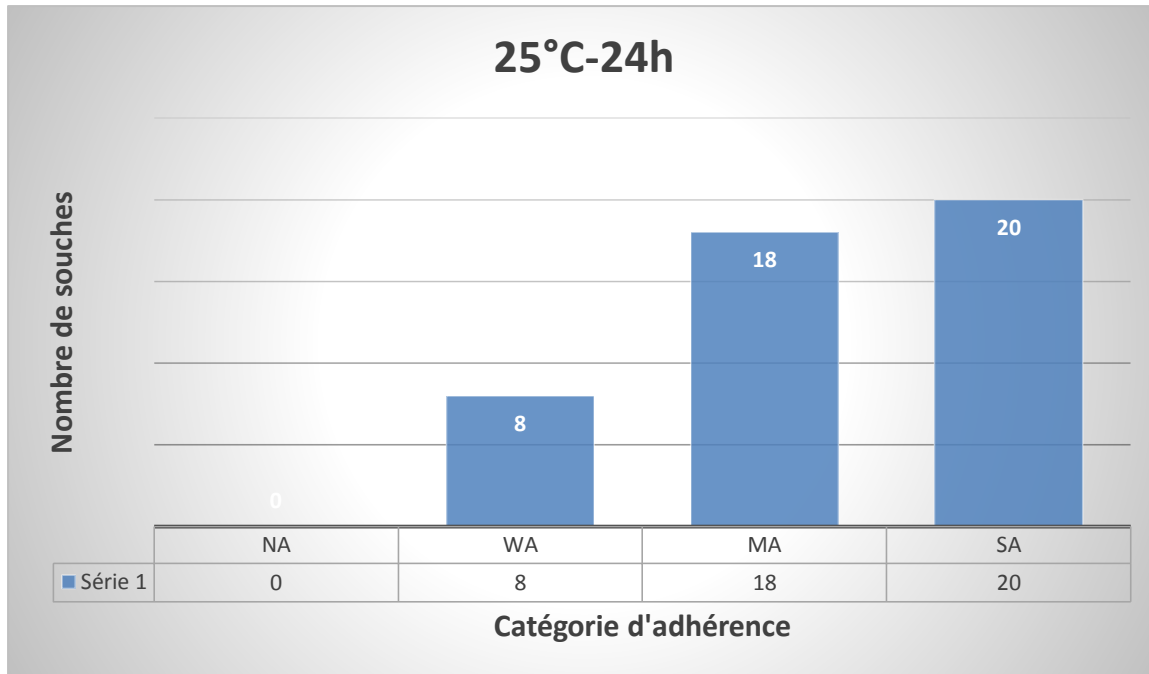


Figure 7. profil des phénotypes d'adhérences des souches à 25°C / 24h

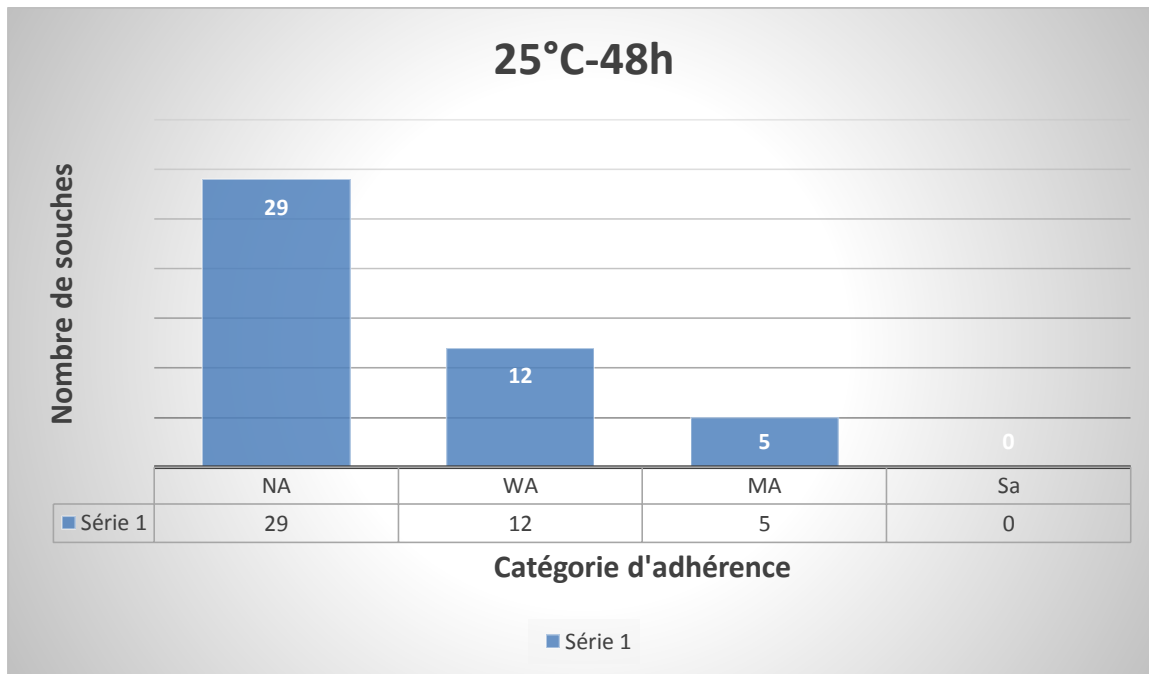


Figure 8. Profil des phénotypes d'adhérences des souches à 25°C / 48h

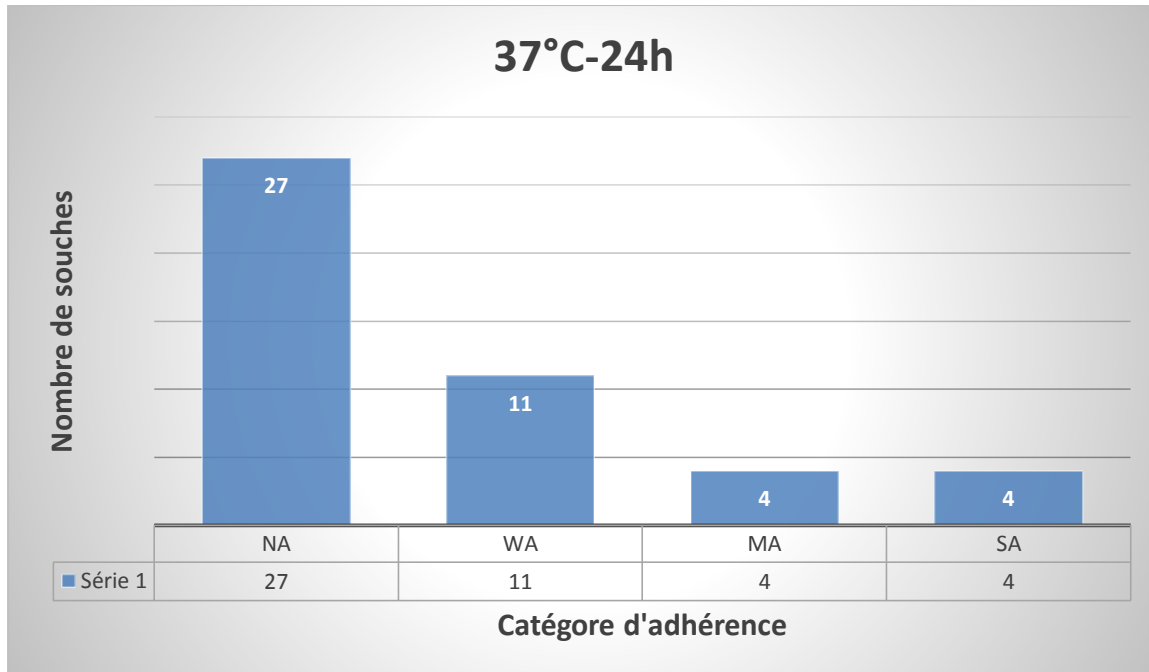


Figure 9. profil des phénotypes d'adhérences des souches à 37°C / 24h

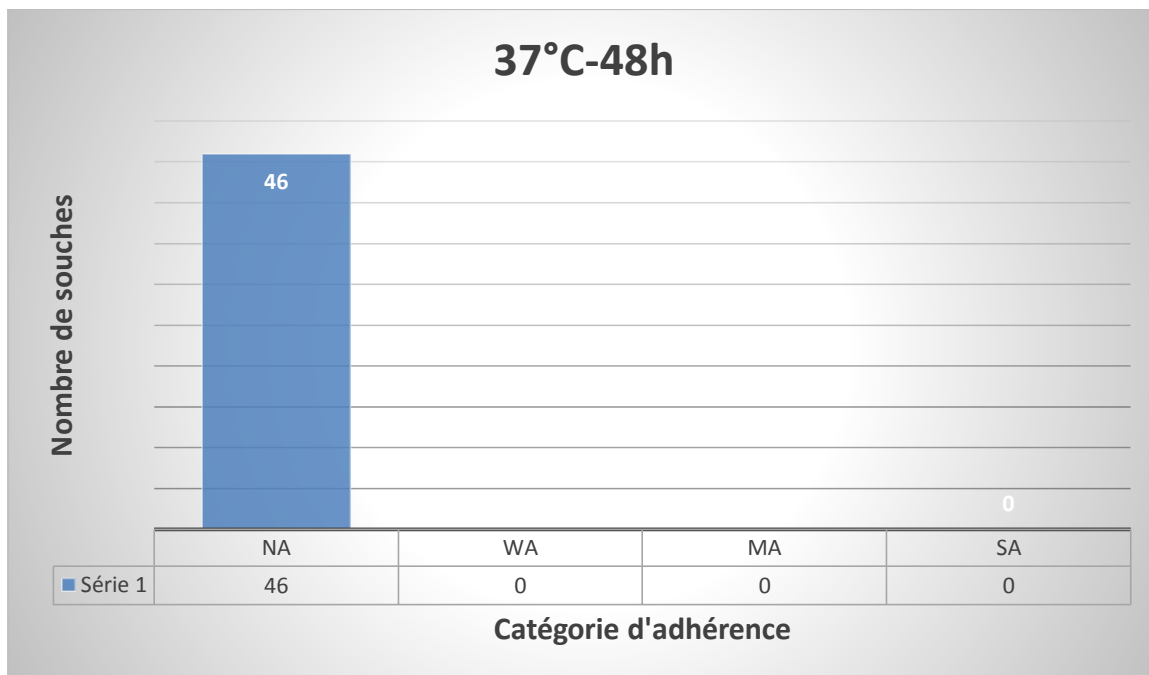


Figure 10. profil des phénotypes d'adhérences des souches à 37°C / 48h

Résumés

الملخص

تشكل الأغشية الحيوية البكتيرية، وخصوصًا تلك التي تُكوّنها المكورات العنقودية والمعويات، مصدر قلق كبير في مجالي الصحة العامة والصناعات الغذائية، لا سيما فيما يتعلق بالعدوى المرتبطة بالمستشفيات وتلوث الأغذية، وذلك بسبب مقاومتها للمضادات الحيوية والمطهرات. تهدف ومدة الحضانة (24 ساعة و48 ساعة) على تكوين الغشاء الحيوي من قبل هذه البكتيريا. تم (37°C و25°C) هذه الدراسة إلى تقييم تأثير درجة الحرارة (25) ، ثم اختبار قدرتها على إنتاج المخاط وتكوين الغشاء الحيوي باستخدام طريقتين: طريقة نوعية API 20E عزل السلالات، وتحديد استخدامها باستخدام مجموعة ، مما CRA ، وطريقة كمية باستخدام تقنية الميكروبلات. يُظهر النتائج أن جميع السلالات تنتج مستعمرات حمراء أو وردية على وسط CRA على وسط لمدة 25°C يدل على غياب الغشاء الحيوي المرئي. وعلى النقيض من ذلك، تكشف طريقة الميكروبلات أن التكوين الأمثل للغشاء الحيوي يحدث عند 25 لمدة 24 ساعة (40%)، وتختفي تمامًا عند 48 ساعة (36%)، وعند 37°C 24 ساعة (بنسبة التصاق 100%). وتقل هذه القدرة عند 25 CRA لمدة 48 ساعة. وبالتالي، فإن تكوين الغشاء الحيوي يتأثر بشدة بالظروف البيئية، وتثبت طريقة الميكروبلات أنها أكثر حساسية من وسط 37°C.

الكلمات المفتاحية: بيوفيلم، بكتيريا معوية، مكورات عنقودية، درجة الحرارة.

Resumé

Les biofilms bactériens, notamment ceux formés par les staphylocoques et les entérobactéries, représentent un enjeu majeur en milieu hospitalier en raison de leur résistance aux antibiotiques et aux désinfectants. Cette étude vise à évaluer l'effet de la température (25°C et 37°C) et du temps d'incubation (24h et 48h) sur la formation de biofilm par ces bactéries. Les souches ont été isolées, identifiées par galerie API 20E, puis testées pour leur pouvoir mucoviscositant et leur capacité de formation de biofilm à l'aide de deux méthodes : qualitative sur gélose CRA et quantitative par la méthode de microplaque. Les résultats montrent que toutes les souches produisent des colonies rouges ou roses sur CRA, indiquant une absence de biofilm visible. En revanche, la méthode de microplaque révèle que la formation optimale du biofilm se produit à 25°C pendant 24h (100 % d'adhérence). Cette capacité diminue à 25°C pendant 48h (36 %), à 37°C pendant 24h (40 %), et disparaît totalement à 37°C pendant 48h. Ainsi, la formation du biofilm est fortement influencée par les conditions environnementales, et la méthode de microplaque se montre plus sensible que le milieu CRA.

Mots clés : Biofilm, Staphylocoques, Entérobactéries, Température.

Abstrat

Bacterial biofilms, particularly those formed by staphylococci and enterobacteria, represent a major concern in hospital settings due to their resistance to antibiotics and disinfectants. This study aims to evaluate the effect of temperature (25°C and 37°C) and incubation time (24h and 48h) on biofilm formation by these bacteria. The strains were isolated, identified using the API 20E gallery, then tested for their mucoid phenotype and biofilm-forming ability using two methods: a qualitative method on CRA agar and a quantitative method using the microplate technique. The results show that all strains produce red or pink colonies on CRA, indicating the absence of visible biofilm. In contrast, the microplate method reveals that optimal biofilm formation occurs at 25°C for 24h (100% adherence). This ability

decreases at 25°C for 48h (36%), at 37°C for 24h (40%), and disappears completely at 37°C for 48h. Thus, biofilm formation is strongly influenced by environmental conditions, and the microplate method proves to be more sensitive than the CRA medium.

Keywords : biofilm, Staphylococci, Enterobacteria, Temperature.



Déclaration de correction de mémoire de master 2025

Référence du mémoire N°: / 2025 PV de soutenance N°: / 2025

Nom et prénom (en majuscule) de l'étudiant (e) : **Mansouri Amani ; Meddon Khaoula**
 لقب و إسم الطالب (ة) : **م. منصورى أمانى ; م. مدون خاولا**

La mention التقدير	Note (./20) العلامة	L'intitulé de mémoire المذكرة
.....	عنوان المذكرة
Evaluation de l'effet de température et le Temps d'incubation sur la formation du bio film par les souches Enterobacter et Staphylococcus		

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

<p>Déclaration : Je soussigné (e), Dr. Amani S.A.A (grade) M.A.A à l'université de Biskra, avoir examiné intégralement ce memoire après les modifications apportées par l'étudiant. J'atteste que : * le document à été corrigé et il est conforme au model de la forme du département SNV * toutes les corrections ont été faites strictement aux recommandations du jury. * d'autres anomalies ont été corrigées</p>	<p>تصريح : أنا الممضي (ة) أسفله (الرتبة) بجامعة أصرح بأنني راجعت محتوى هذه المذكرة كليا مراجعة دقيقة وهذا بعد التصحيحات التي أجراها الطالب بعد المناقشة، وعليه أشهد بأن : * المذكرة تتوافق بشكلها الحالي مع النموذج المعتمد لقسم علوم الطبيعة والحياة. * المذكرة صححت وفقا لكل توصيات لجنة المناقشة * تم تدارك الكثير من الإختلالات المكتشفة بعد المناقشة</p>
---	--

<p>Décision : Sur la base du contenu scientifique, de degré de conformité et de pourcentage des fautes linguistiques, Je décide que ce mémoire doit être classé sous la catégorie</p>	<p>قرار : اعتمادا على درجة مطابقتها للنموذج ، على نسبة الأخطاء اللغوية وعلى المحتوى العلمي أقرر أن تصنف هذه المذكرة في الدرجة :</p>												
<table border="1"> <tr> <td>acceptable مقبول</td> <td>ordinaire عادي</td> <td>bien حسن</td> <td>très bien جيد جدا</td> <td>excellent ممتاز</td> <td>exceptionnel متميز</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>D</td> <td>C</td> <td>B</td> <td>A</td> <td>A+</td> </tr> </table>	acceptable مقبول	ordinaire عادي	bien حسن	très bien جيد جدا	excellent ممتاز	exceptionnel متميز	E	D	C	B	A	A+	
acceptable مقبول	ordinaire عادي	bien حسن	très bien جيد جدا	excellent ممتاز	exceptionnel متميز								
E	D	C	B	A	A+								



الأستاذ المشرف
 التاريخ
 2025 / /
 [Signature]