

LISTE DES FIGURES

Figure 1: <i>Salmonella enterica</i>	5
Figure 2: Physiopathologie de la salmonellose non typhique	7
Figure 3: Biofilm de <i>Salmonella</i> Typhimurium cultivé sur bouillon LB à 37°C sur microplaque 24 puits	8
Figure 4: Représentation schématique des différentes étapes de la formation d'un biofilm ...	10
Figure 5: <i>Salmonella</i> sur gélose SS	13
Figure 6: <i>Salmonella</i> cultivé sur gélose XLD	14
Figure 7: Culture de <i>Salmonella</i> sur milieu LB	14
Figure 8: Microplaque 96 puits	15
Figure 9: Spectrophotomètre	17
Figure 10: Logiciel Microplate Manager Software	17
Figure 11: Variation de la capacité de formation de biofilm après 24h d'incubation.....	21
Figure 12: Variation de la capacité de formation de biofilm après 48h d'incubation.....	23
Figure 13: Comparaison du potentiel de formation de biofilm après 24h et 48h.....	24
Figure 14: Variation du potentiel de formation de biofilm après 24h et 48h d'incubation.....	24
Figure 15: Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction de l'origine des souches bactériennes	25

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractères différentiels des espèces et sous-espèces du genre <i>Salmonella</i>	4
Tableau II : Classification de la formation de biofilm selon Stepanovic <i>et al.</i> (2004).....	18
Tableau III : Formation de biofilm des souches de salmonelles après 24h d'incubation.....	20
Tableau IV : Formation de biofilm des souches de salmonelles après 48 h d'incubation.....	22
Tableau V : Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction des sérotypes	26
Tableau VI : Résultats du test de sensibilité du biofilm au chloramphénicol.....	27

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AI	Auto Inducteur
ARN	Acide ribonucléique
Aw	Activité de l'eau
CFA	Colony Forming Antigen
CHNEAR	Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer
CS	Citrate de Simone
DO	Densité Optique
EPS	Extracellular Polymeric Substances
GCC	Gélose Cœur Cervele
GTS	Gélose Trypticase Soja
IPD	Institut Pasteur de Dakar
KH	Kligler Hajna
LB	Luria Bertani
LCR	Liquide céphalorachidien
LPS	Lipopolysaccharide
MMN	Mannitol-Mobilité-Nitrate
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside
SNT	<i>Salmonella</i> non typhique
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
Subsp	Sous espèces
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
UI	Urée Indole
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
XLD	Xylose-Lysine-Désoxycholate

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Liste des consommables regroupant les réactifs et les non réactifs

Annexe 2 : Quantification de biofilms sur microplaque 96 puits

Annexe 3 : Mécanisme de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte

SOMMAIRE

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	III
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	V
LISTE DES ANNEXES	V
RESUME	X
Introduction	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.1. Historique des salmonelles	3
I.2. Taxonomie	3
I.3. Bactériologie	5
I.3.1. Caractères morphologiques	5
I.3.2. Caractères cultureux.....	5
I.3.3. Caractères biochimiques	5
I.3.4. Caractères antigéniques.....	6
I.4. Epidémiologie des salmonelloses non typhiques.....	6
I.5. Pathogénicité et aspects cliniques des salmonelloses non typhiques.....	7
I.6. La formation de biofilms bactériens	7
I.6.1. Les étapes de la formation de biofilm	8
I.6.1.1. Adhérence réversible.....	8
I.6.1.2. Adhérence irréversible	9
I.6.1.3. Développement précoce du biofilm	9
I.6.1.4. Maturation du biofilm	9
I.6.2. Le quorum-sensing.....	10
I.6.3. La composition du biofilm.....	11
I.6.4. Diagnostic d'une infection à biofilm.....	11
Chapitre II : Matériel et Méthodes	12
II.1. Cadre et période d'étude.....	12
II.2. Matériels	12
II.2.1. Souches bactériennes	12
II.2.2. Milieux de culture.....	12
II.2.3. Microplaque.....	15
II.3. Méthodes d'étude	15
II.3.1. Culture des bactéries.....	15

II.3.2. Identification des bactéries	15
II.3.3. Méthode de formation de biofilm sur microplaque	17
II.3.4. Test de sensibilité des bactéries du biofilm au chloramphénicol.....	18
II.3.5. Analyses statistiques.....	19
Chapitre III : Résultats et Discussion	20
III.1. Résultats	20
III.1.1. Evaluation du potentiel de formation de biofilm après 24h d'incubation	20
III.1.2. Evaluation de la capacité de formation de biofilm après 48 H d'incubation.....	22
III.1.3. Comparaison du potentiel de formation de biofilm après 24h et 48h d'incubation	24
III.1.4. Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction de l'origine des souches bactériennes.....	25
III.1.5. Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction du sérotype	25
III.1.6. Sensibilité des bactéries du biofilm au chloramphénicol	26
III.2. Discussion	27
Conclusion Perspectives et Recommandations	30
Annexes	VII

Introduction

La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental (état planctonique). L'attachement sur une surface est une stratégie de survie qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement. L'état planctonique pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à l'autre. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de « biofilm » qu'il a défini comme suit : « Un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules adhérentes de manière irréversible à un substrat, une interface ou entre elles. Cette communauté est enrobée d'une matrice de substances polymériques extracellulaires auto-sécrétées et qui présentent un phénotype particulier en termes de taux de croissance et de transcription de gènes. » (**Costerton et al.**, 1999).

Jusqu'à récemment, ces biofilms, et l'activité bactérienne qui en résulte, étaient connus pour les problèmes inhérents à leur capacité de recouvrir et de corroder les canalisations ou encore les coques de bateaux. Depuis quelques années, il est apparu que leur importance dans le milieu médical est capitale, puisque 65 % des infections bactériennes et 60 % des infections nosocomiales et dans toutes les infections prothétiques chez l'homme impliquent des biofilms (**Chicurel**, 2000).

Les salmonelles qui sont des entérobactéries sont connues par leur aptitude à se développer sous forme de communautés agrégées "sessiles", c'est-à-dire, attachées à une surface formant des « tapis » qui conduisent à la colonisation totale de celle-ci. Ces tapis bactériens constituent des « biofilms » (**Prouty et Gunn**, 2003). L'étude de ces bactéries productrices de biofilms suscite donc un grand intérêt, car elles pourraient servir de source de contamination microbienne qui peut conduire à l'altération des aliments ou de transmission de maladies. L'évaluation de la dynamique de la formation de biofilms peut être utile pour prévenir leur formation, et ainsi, réduire les risques sanitaires liés à la formation de biofilms par des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. C'est dans ce contexte que nous avons mené ces travaux de recherche qui avaient pour objectif général, de contribuer à la connaissance de la formation de biofilm chez les salmonelles non typhiques.

Comme objectifs spécifiques nous allons :

- ❖ Déterminer la capacité des salmonelles non typhiques (SNT) à former un biofilm

- ❖ Comparer la formation de biofilm des SNT en fonction de la durée d'incubation (24h et 48h)
- ❖ Déterminer la sensibilité des biofilms de SNT au chloramphénicol

Ainsi notre travail va s'articuler autour de trois (3) chapitres :

- ❖ La synthèse bibliographique
- ❖ Le matériel et la méthodologie utilisés
- ❖ Les résultats obtenus et leur discussion

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Historique des salmonelles

Les salmonelles sont des entérobactéries du genre *Salmonella* tirant leur nom de Daniel Salmon qui était le directeur du Bureau of Animal Industry lorsque le premier germe du genre, *Salmonella choleraesuis*, a été isolé par Théobald Smith, chez les cygnes atteints de diarrhée ressemblant au cholera (**Le Minor**, 1992)

En 1880, Eberth observa dans des coupes de rate et de ganglions lymphatiques d'un patient qui est mort de la typhoïde, le premier bacille de *Salmonella* agent de la fièvre typhoïde mais la culture in vitro de cette bactérie fut mise au point en 1884 par Gaffky.

En 1896 Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de *Salmonella* à l'aide d'un nouveau test qu'il a appelé sérodiagnostique de Widal (**Grimont et al.**, 2000).

I.2. Taxonomie

La taxonomie et la nomenclature des salmonelles ont subi une évolution sans cesse dans le temps.

Avant que la taxonomie de *Salmonella* ne soit établie sur des bases moléculaires, les sous espèces étaient considérées comme des sous-genres et les sérovars comme des espèces. On avait ainsi les sous-genres I (*S. enterica* subsp. *enterica*), II (*S. enterica* subsp. *salamae*), III (ancien genre *Arizona* ; subdivisé en IIIa (sérotypes monophasiques), *S. enterica* subsp. *arizonae*, et IIIb (sérotypes diphasiques), *S. enterica* subsp. *diarizonae*), IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*), V (*S. bongori*), et VI (*S. enterica* subsp. *indica*) (**Grimont et al.**, 2000).

L'avènement de la taxonomie moléculaire allait donner une base objective à la classification. Les hybridations génomiques ADN-ADN et l'analyse comparative des gènes codant pour les ARN ribosomiaux ont mis en évidence 02 espèces génomiques dans le genre *Salmonella* : *S. enterica* espèce habituelle et *S. bongori* (**Grimont et al.**, 2000 ; **Tindal et al.**, 2005). La première espèce est elle-même subdivisée en 6 sous espèces : *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica*, différenciées entre elles par des caractéristiques biochimiques (**Tableau I**) (**Grimont et Weill**, 2007).

Tableau I : Caractères différentiels des espèces et sous-espèces du genre *Salmonella* (Grimont et Weill, 2007)

Espèce	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Caractères							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gélatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamyltransférase	+ ^(*)	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Habitat de la majorité des souches	Animaux à sang chaud		Animaux à sang froid et environnement				

(a) = *d*-tartrate.

(*) = Typhimurium d, Dublin -.

+ = 90 % ou plus de résultats positifs.

- = 90 % ou plus de résultats négatifs.

d = résultats différents suivant les sérovars de la sous-espèce considérée.

L'appellation des sérovars a subi aussi une évolution dans le temps et afin de standardiser la nomenclature et éviter des causes éventuelles de confusion, au Congrès International de Microbiologie de Moscou en 1966, il a été décidé que les noms composés seraient désormais condensés en noms simples et ils ne doivent plus être écrits en italique. La première lettre doit être une majuscule (caractères pleins) : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Typhimurium. Le nom de la sous-espèce (subsp. *enterica*) peut ne pas être mentionné parce que seuls les sérovars de la sous-espèce *enterica* ont un nom. Les sérovars des autres sous-espèces de *S. enterica* et ceux de *S. bongori* sont désignés uniquement par leur formule antigénique, exemple *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, ou *S. enterica* sérovar Typhimurium, ou *Salmonella* ser. Typhimurium. On connaît plus de 2600 sérotypes (ou sérovars) et la liste n'est pas close, classés sur la base de la diversité du lipopolysaccharide (antigène O) et des antigènes flagellaires H suivant un schéma appelé schéma de White-Kauffmann-LeMinor (Grimont et Weill, 2007).

I.3. Bactériologie

I.3.1. Caractères morphologiques

Le genre *Salmonella* (**Figure 1**), appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, est caractérisé par des bacilles à coloration Gram négatif, non sporulant, la plupart du temps doués d'une mobilité propre grâce à des flagelles péritriches (à l'exception de *Salmonella Gallinarum*). La taille des bâtonnets varie entre 2 et 5 μm de longueur sur 0,7 à 1,5 μm de largeur (**Korsak et al.**, 2004).

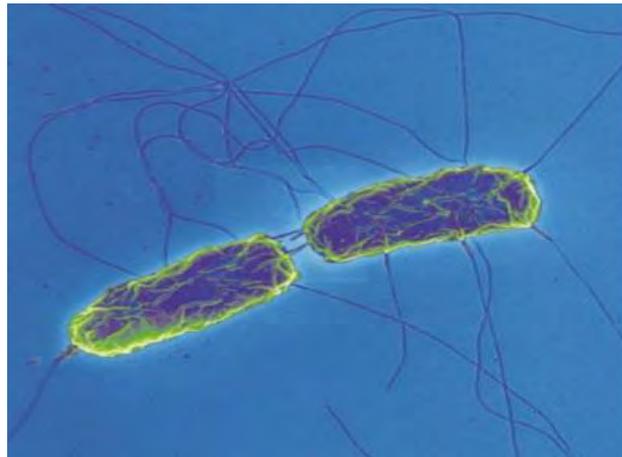


Figure 1 : *Salmonella enterica* (www.medecinesciences.org) consulté le 14/10/2019

I.3.2. Caractères cultureux

Les salmonelles sont des bactéries mésophiles de type aéro-anaérobie facultatif se présentant sous forme de bacilles à Gram négatif. Elles sont peu exigeantes d'un point de vue nutritionnel car pouvant pousser facilement dans un milieu ordinaire à base d'extrait de viande. Leur développement est optimal à des températures proches de la température corporelle des animaux à sang chaud, 35 à 37°C, et un pH de 6,5 à 7,5. Leur multiplication reste assurée à des températures de 6,7 à 41°C. Le large spectre de températures (-20 à 60°C) et de pH (4,1 à 9) auxquels elles sont capables de survivre, ainsi que leur capacité à résister à l'activité de l'eau (aw) de 0,94 en font des bactéries extrêmement résistantes aux conditions environnementales, même difficiles et expliquent leur caractère ubiquiste (**Lebrazi**, 2011).

I.3.3. Caractères biochimiques

Les caractéristiques biochimiques des salmonelles sont leurs capacités à réduire le nitrate en nitrite mais aussi de se contenter du citrate comme source de carbone. Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz.

Il existe d'autres caractéristiques biochimiques permettant l'identification des salmonelles tels que l'absence d'uréase et de tryptophane désaminase, l'absence de production d'indole et

d'acétoïne (test de Voges-Proskauer négatif), l'absence de fermentation du lactose, du saccharose, de l'inositol, de l'amygdaline, de l'adonitol et du 2-cétogluconate, la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir du thiosulfate (présence d'une thiosulfate réductase), et la décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine. (Korsak, 2004 ; Lebrazi, 2011).

I.3.4. Caractères antigéniques

Il existe plus de 2600 sérovars de *Salmonella* qui se différencient par la nature de leurs antigènes. Donc l'identification précise d'une *Salmonella* consiste à déterminer sa formule antigénique. Comme toutes les entérobactéries, les salmonelles peuvent posséder trois types d'antigènes ayant un intérêt diagnostique.

L'antigène somatique (O), est un antigène de la paroi qui est porté par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS).

L'antigène flagellaire (H) est un polymère de flagelline, qui est une protéine de structure des flagelles. Cet antigène est thermolabile, détruit par la chaleur à 100° C, par l'action de l'alcool et par les ferments protéolytiques.

L'antigène de surface (Vi) est un antigène de l'enveloppe, il a été identifié chez trois types de sérovars : Typhi, Paratyphi C et Dublin mais toutes les souches de ces sérovars ne possèdent pas forcément cet antigène (Rycroft, 2000).

I.4. Epidémiologie des salmonelloses non typhiques

Les maladies d'origine alimentaire comme les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont une cause importante de morbidité et de mortalité, surtout chez les enfants à travers le monde. Certains serovars (sérotypes) du genre *Salmonella* tels que Typhimurium et Enteritidis sont souvent responsables de ces infections (Weill, 2008).

Les salmonelloses non typhiques, improprement dites mineures, sont responsables d'infections sporadiques ou épidémiques, le plus souvent en raison de la contamination des aliments. Elles entraînent des gastroentérites, des formes invasives étant observées chez les malades à risques, en particulier les malades immunodéprimés (VIH, Paludisme...). C'est une des causes majeures de mortalité infantile en Asie et en Afrique (Aubry et Gauzere, 2018).

Contrairement aux pays développés, en Afrique subsaharienne, les salmonelles non typhiques (SNT) sont identifiées comme les principales bactéries isolées dans le sang chez les adultes et les enfants et sont associées à 20 à 25% de décès (Abdelkader *et al.*, 2017).

I.5. Pathogénicité et aspects cliniques des salmonelloses non typhiques

En général, les salmonelles peuvent entraîner un portage sain, qui se limite strictement au tube digestif, avec une excrétion de bactéries allant de moins de 10^4 à 10^7 germes par gramme de fèces. L'excrétion fécale peut être intermittente, on parle de porteur inapparent. Il peut aussi arriver que, les salmonelles soient hébergées dans les monocytes et les macrophages (**Figure 2**) où elles sont capables de survivre sans se multiplier. Dans certains cas avec des symptômes diarrhéiques et d'hyperthermie, lorsque le système immunitaire de l'hôte est soit déficient, soit dépassé par le nombre de salmonelles envahissant l'organisme. Cette pathologie peut s'exprimer à la faveur d'ingestion d'une dose de l'ordre de 10^5 à 10^8 germes soit un portage sain avec passage de quelques bactéries dans l'organisme mais sans symptômes apparents (**Ahmer et Gunn, 2011**). Plusieurs sérotypes de salmonelles peuvent causer une infection systémique chez les humains au statut immunitaire diminué. Chez le sujet sain, la plupart de ces sérotypes engendrent une diarrhée fébrile, des vomissements, des douleurs abdominales. Par contre, chez les sujets âgés ou immunodéficients, des bactériémies, des septicémies et des localisations extradiigestives, en particulier vasculaires sont observés (**Korsak, 2004**).

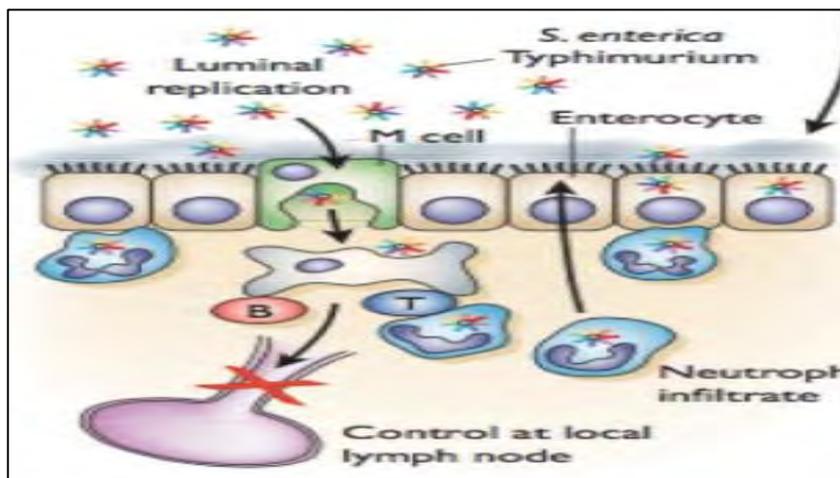


Figure 2 : Physiopathologie de la salmonellose non typhique (Sansonetti, 2018)

I.6. La formation de biofilms bactériens

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée aux observations d'Antonie Van Leeuwenhoek qui, au XVIIe siècle et grâce à un microscope de son invention, mit en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. Bien que d'abord identifiés fixés sur un support solide, ce sont les formes libres et planctoniques des microorganismes, qui ont été les plus étudiées. Les salmonelles ont cette capacité à former un complexe associé à la surface colonisée (**Figure 3**), ce qui généralement les protège contre le

stress environnemental, les désinfectants, les antibiotiques mais aussi contre le système immunitaire de l'hôte (**Annexe 3**) (Costerton, 1999).

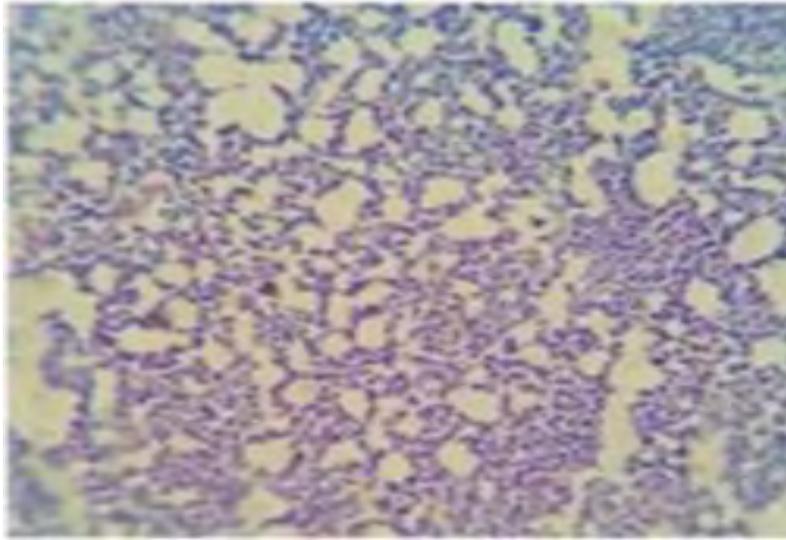


Figure 3 : Biofilm de *Salmonella* Typhimurium cultivé sur bouillon LB à 37°C sur microplaque 24 puits (Ghasemmahdi *et al.*, 2015)

I.6.1. Les étapes de la formation de biofilm

Le processus de formation des biofilms (**Figure 4**) se résume en cinq étapes : adhésion réversible des bactéries de la phase planctonique à une surface, irréversibilité de l'adhésion correspondant à la synthèse de structures à la surface des bactéries, formation de microcolonies, puis développement de ces microcolonies traduisant le stade de maturation du biofilm et colonisation de nouvelles surfaces (**Roux et Ghigo**, 2006).

I.6.1.1. Adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par un mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles) (**Beloin *et al.***, 2008).

L'adhésion fait intervenir différents types d'interactions que l'on pourrait classer en interaction électrostatique et non électrostatique qui sont des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals ...). A ce stade, la bactérie peut se détacher de la surface et retrouver son état planctonique (**Michael Dunne Jr**, 2002)

L'attachement réversible est fortement influencé à la fois par les conditions environnementales telles que le pH et les forces ioniques ou la température du milieu, par la nature de la surface elle-même, avec la rugosité qui augmente la surface d'adhésion ou les surfaces hydrophobes telles que les plastiques qui sont plus susceptibles d'être colonisées par les bactéries que les surfaces hydrophiles telles que le verre et le métal (**Donlan**, 2002).

I.6.1.2. Adhérence irréversible

La transition de l'attachement réversible vers l'irréversible implique une fixation active et spécifique des microorganismes sur un support. Cette adhésion est possible grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui forment des ponts de fixation entre la cellule bactérienne et la surface ou entre deux cellules.

Les structures d'adhésion diffèrent selon le type de micro-organisme. Pour l'adhésion des bactéries Gram négatif, seront impliqués les pili, les curli, les capsules et le glycocalyx. Quant à l'adhésion des bactéries Gram positif ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalyx qui sont impliqués. D'autres structures peuvent également être impliquées (**Van Houdt et Michiels, 2005**).

I.6.1.3. Développement précoce du biofilm

Il se matérialise par la production continue d'exopolysaccharides, mais aussi par une multiplication des cellules bactériennes adhérentes à la surface.

Les bactéries s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice extracellulaire (**Tolker-Nielsen et Molin, 2000**).

I.6.1.4. Maturation du biofilm

L'étape de maturation consiste au développement des microcolonies et à leur structuration. Elles vont se développer en piliers d'épaisseur variable et vont être englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces qui séparent les microcolonies vont devenir les canaux du biofilm (**Van Houdt et Michiels, 2005**).

La maturation du biofilm est divisée en deux phases. La première phase est marquée par des régulations de gènes engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elle concerne essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies, cela suggère une faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support. Soixante-dix gènes subiraient des modifications au cours de la maturation d'un biofilm (**Whiteley et al., 2001**). Durant la seconde phase, il y aura une synthèse protéique importante différente de celle ayant lieu lors de la première phase (**Sauer et al., 2002 ; Clutterbuck et al., 2007**).

I.6.1.5. Détachement des bactéries

Lorsque le biofilm atteint une certaine épaisseur, la dernière étape de formation peut avoir lieu. C'est l'étape de dispersion du biofilm. Ce phénomène de dispersion est induit par le vieillissement du biofilm ou par certains stress ou carences. Des cellules sous la forme planctonique vont être libérées vers le milieu extérieur. Le détachement des micro-organismes est possible grâce à des remaniements génétiques. Ceci va donc promouvoir la diversité génétique et va également favoriser la colonisation de nouvelles surfaces (**Clutterbuck *et al.*, 2007**).

La dispersion peut s'effectuer passivement via l'action de stress hydrodynamique ou activement. La dispersion passive peut être divisée en trois processus qui sont : l'érosion, le relargage (« sloughing ») ou l'abrasion. L'érosion correspond à un détachement continu de cellules individuelles ou de petites parties du biofilm, tandis que le relargage est une perte rapide et massive du biofilm. Quant à l'abrasion, c'est un détachement dû à la collision de particules du fluide liquide avec le biofilm. Le taux d'érosion devient plus important lorsque l'épaisseur du biofilm augmente. La libération active de cellules d'un biofilm se fait en réponse à certains signaux environnementaux comme l'accumulation de déchets métaboliques toxiques ou la carence en carbone, azote, oxygène ainsi que l'appauvrissement du milieu en nutriments (**Gjermansen *et al.*, 2005 ; Bryers, 2009**).

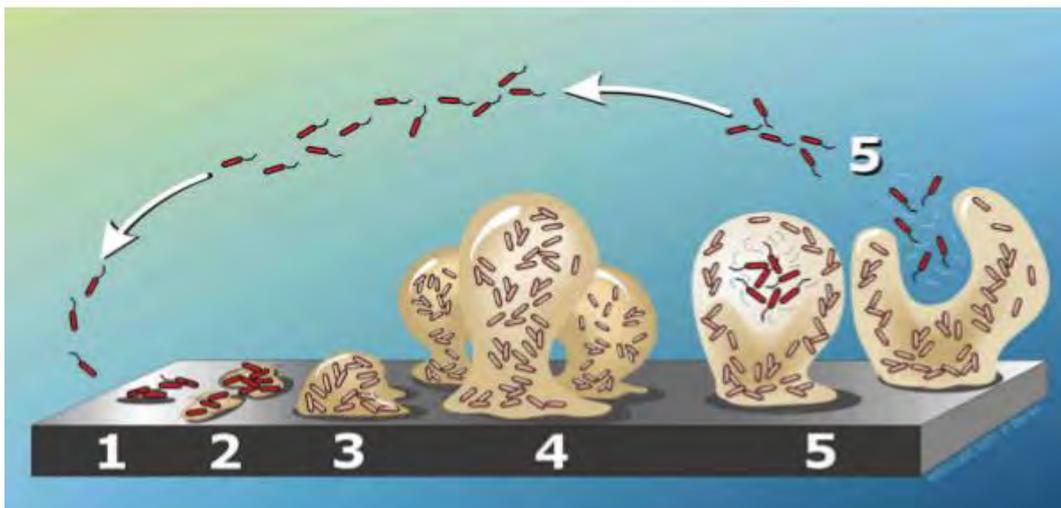


Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes de la formation d'un biofilm (Van Houdt et Michiels, 2005)

I.6.2. Le quorum-sensing

Le quorum-sensing ou communication entre cellules bactériennes est un processus par lequel les bactéries adoptent un comportement spécifique de la vie en communauté, par régulation de leur expression génétique en réponse à la densité cellulaire via la production d'auto-inducteur.

Chez plusieurs espèces de bactérie, il est reporté que la formation des biofilms est partiellement régulée par le quorum-sensing. Il implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signales appelées des auto-inducteurs (AI). Chez les bactéries à Gram négatif, l'auto-inducteur est une homosérine lactone, alors que chez les bactéries à Gram positif, c'est un oligopeptide appelé phéromone (**Roux et Ghigo, 2006 ; Steenackers et al., 2012**).

I.6.3. La composition du biofilm

L'utilisation de la microscopie optique, puis confocale, a permis de montrer que le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes, séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux. Ceux-ci y assurent la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation. Ainsi, le biofilm n'est pas un milieu homogène, mais un environnement structuré qui présente souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales (**Donlan, 2002**)

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm. Cette matrice inclut tous les éléments du biofilm autre que les microorganismes. Elle est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Néanmoins, on peut également y trouver d'autres composants, tels que de l'ADN, de l'ARN et des lipides (**Annexe 4**) (**Sutherland, 2001**).

I.6.4. Diagnostic d'une infection à biofilm

Actuellement les outils diagnostiques ont, pour l'essentiel, été développés pour leur efficacité sur des bactéries en phase planctonique. Néanmoins certains sont utilisés pour diagnostiquer des infections à biofilm.

Il y'a le diagnostic indirect qui se base sur les signes cliniques tels que la présence d'une infection de plus de 30 jours, la présence d'une infection subaiguë, une réinfection à l'arrêt du traitement, la présence d'un biofilm visible... D'autres outils diagnostique utilisent la détection de biomarqueurs topiques telles que la détection de produit de la matrice ou la détection d'enzymes inflammatoires (par exemple les protéases, les élastases) (**Delorme, 2012**).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1. Cadre et période d'étude

Cette étude s'est déroulée sur une période de neuf (9) mois (juillet 2019 à mars 2020) au Pôle de Microbiologie de l'Institut Pasteur de Dakar. Le Pôle de Microbiologie est un pôle de recherche dirigé par Docteur Yakhya DIEYE. Les thématiques principales de recherche sont axées sur l'étude du microbiome, de l'antibiorésistance, des infections entériques, etc. Ainsi, les activités développées au sein du pôle sont diverses. Elles comprennent la caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries entéropathogènes avec un focus sur l'épidémiologie moléculaire et la résistance aux antibiotiques.

Par ailleurs, le Pôle de Microbiologie participe à la formation d'étudiants de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar dans le cadre de la préparation de différents diplômes universitaires (Master, Doctorat, diplôme d'Ingénieur). Le laboratoire est également impliqué dans les enseignements universitaires, en particulier dans la formation en Microbiologie des médecins, pharmaciens et techniciens de laboratoire.

II.2. Matériels

II.2.1. Souches bactériennes

Au total 50 souches de salmonelles susceptibles de produire des biofilms ont été isolées à partir de divers échantillons biologiques (selles, urines, pus, LCR, liquide pleural, sang) au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR).

Les isolats bactériens ont été classés en souches invasives (celles provenant des urines, du LCR, du liquide pleural, du pus et du sang) et non invasives (celle provenant des selles).

II.2.2. Milieux de culture

Pour l'isolement et la purification des souches de salmonelles, des milieux gélosés ont été utilisés. La gélose nutritive qui est un milieu non sélectif largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants.

Le milieu *Salmonella- Shigella* (SS) qui est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement des salmonelles et des shigelles dans les prélèvements cliniques et les denrées alimentaires.

La gélose SS est un milieu modérément sélectif où l'inhibition des microorganismes à Gram positif est due à la présence de sels biliaires, de vert brillant et de citrate de sodium. Les concentrations élevées en citrate et thiosulfate de sodium limitent le développement des coliformes et évitent l'envahissement du milieu par les *Proteus*. La fermentation du lactose en acide est révélée, en présence de rouge neutre, par la formation de colonies rouges. Les microorganismes lactose négatif présentent des colonies incolores. En présence de thiosulfate

et de citrate ferrique, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent des colonies à centre noir (**Figure 5**).



Figure 5 : *Salmonella* sur gélose SS

La gélose XLD (Xylose-Lysine-Désoxycholate) est aussi utilisée car étant un milieu pour l'isolement des entérobactéries pathogènes. Le désoxycholate de sodium assure l'inhibition de la flore contaminante à Gram positif. La xylose est fermentée par presque tous les germes entéropathogènes, à l'exception des Shigelles qui sont ainsi différenciées des autres bactéries. Après avoir utilisé la xylose, les salmonelles décarboxylent la lysine (par l'intermédiaire de leur lysine-décarboxylase) en cadavérine, ce qui provoque une augmentation de pH. En milieu alcalin, les colonies de salmonelles se présentent sous le même aspect que les shigelles. Les colonies qui se développent sont de couleur rouge en présence de l'indicateur, le rouge de phénol. L'addition de lactose et de saccharose au milieu permet aux coliformes qui décarboxylent la lysine de produire un excès d'acidité faisant virer l'indicateur au jaune, ce qui favorise leur différenciation. En milieu alcalin et par réduction du citrate ferrique ammoniacal, les germes pathogènes producteurs de sulfure d'hydrogène se manifestent par un noircissement qui est dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies. Les germes non pathogènes qui ne décarboxylent pas la lysine produisent une acidification résultant des fermentations sucrées. L'abaissement de pH s'oppose au noircissement des colonies (**Figure 6**).

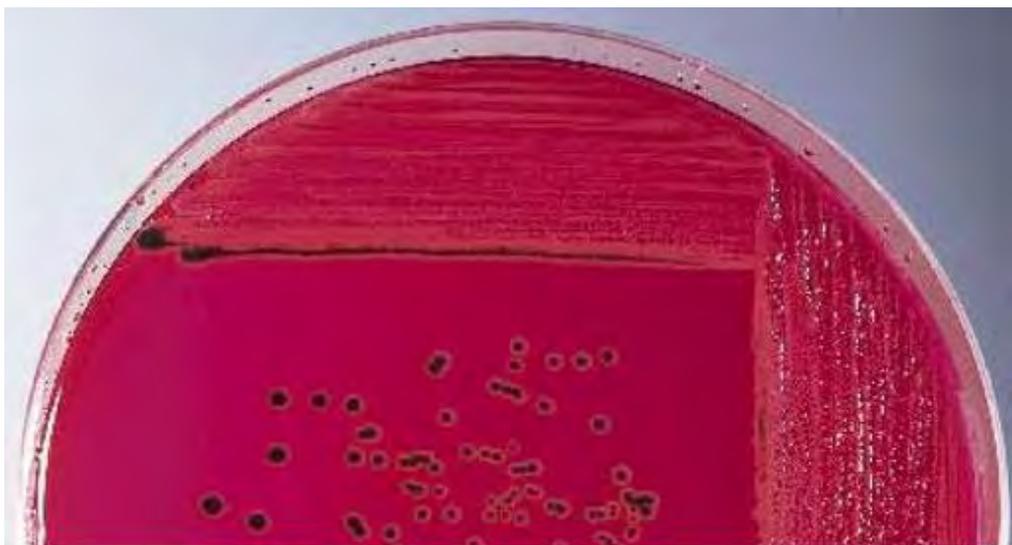


Figure 6 : *Salmonella* cultivé sur gélose XLD

Le bouillon Luria Bertani (LB) a été utilisé pour permettre la croissance bactérienne sur milieu liquide (**Figure 7**). Ce milieu est riche en nutriment et servant initialement à la culture bactérienne.

C'est un milieu fortement utilisé en microbiologie pour la préparation de plasmides d'ADN et de protéines recombinantes. Il reste à ce jour, l'un des milieux les plus utilisés pour le maintien en vie et la culture de lignées recombinantes d'*Escherichia coli*.



Figure 7 : Culture de *Salmonella* sur bouillon LB

II.2.3. Microplaque

Cette méthode de formation de biofilm utilise des microplaques 96 puits qui sont des plaques de polypropylène contenant des puits alignés en 8 rangées et 12 colonnes (**Figure 8**).

C'est une microplaque à fond plat, de marque Eppendorf, fabriquée pour les tests de laboratoire.

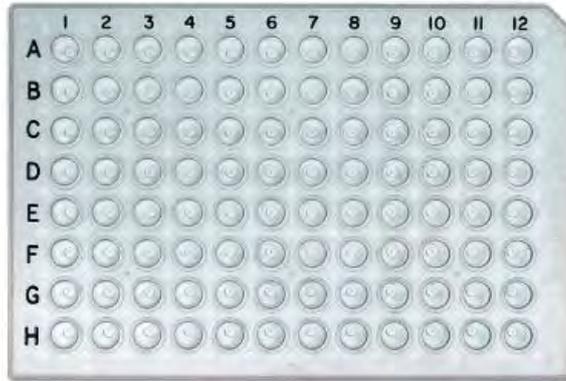


Figure 8 : Microplaque 96 puits (<https://www.fishersci.be/shop/products>) consulté le 18/02/2020)

II.3. Méthodes d'étude

II.3.1. Culture des bactéries

Pour la culture en milieu liquide, une colonie a été transférée dans un tube contenant 5 ml de bouillon LB et incubé à 37°C pendant 24 heures.

Pour l'ensemencement en milieu solide ou gélosé, la technique des quadrants a été utilisée qui consiste à disperser le microorganisme à la surface d'un milieu solide afin d'obtenir des colonies séparées, permettant ainsi de retrouver tous les microorganismes d'un mélange, mais aussi de vérifier la pureté d'une souche bactérienne.

II.3.2. Identification des bactéries

L'identification était basée sur l'exploitation de caractères biochimiques des germes sur la mini galerie d'identification.

Milieu Urée Indole (UI) : C'est un milieu liquide de couleur jaune orange qui est utilisé pour la mise en évidence de la présence de l'uréase et de la production d'indole à partir du tryptophane.

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase en formant de l'indole. La réaction est confirmée après addition du réactif de Kovacs qui est destiné à la mise en évidence de la production d'indole à partir du tryptophane par les bactéries qui possèdent une tryptophanase.

Mode opératoire : Deux à trois colonies pures isolées à partir de milieux de culture étaient inoculées dans de l'urée contenu dans un tube à hémolyse, puis incubé à 37°C pendant 24 heures

dans l'étuve. La présence d'une uréase est indiquée par une coloration rose du milieu. L'absence d'uréase laisse le milieu inchangé. Après avoir versé une à deux gouttes de réactif de Kovacs dans le tube contenant le milieu urée indole ensemencé, la présence d'indole est révélée par l'apparition d'une coloration rose.

Kligler Hajna (KH) : C'est un milieu semi solide qui est utilisé pour la différenciation de la famille des entérobactéries basée sur la production de sulfure d'hydrogène, la fermentation du lactose, du glucose et la présence des gaz ou des bulles d'air.

Mode opératoire : A partir des colonies pures isolées dans les milieux, 500µl d'eau physiologique sont pipetés dans un tube puis deux à trois colonies sont ajoutées dans le tube contenant l'eau physiologique. A l'aide d'une anse métallique ou une anse en plastique, le mélange contenu dans le tube sec est utilisé pour faire l'ensemencement par piqure centrale et au niveau de la pente ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures dans l'étuve. La fermentation du glucose est matérialisée par une coloration jaune du culot. Lorsque la coloration du culot reste inchangée, le glucose n'a pas été utilisé. La fermentation du lactose est révélée par la coloration jaune de la pente. Lorsque la coloration de cette dernière reste inchangée, la bactérie est lactose négatif. La production de sulfure d'hydrogène est indiquée par la présence d'un précipité noir au niveau du culot ou à la jonction pente-culot. La présence de bulles au niveau de cette jonction met en évidence la production de gaz.

Le milieu Mannitol Mobilité Nitrate (MMN) : C'est un milieu semi solide utilisé pour la fermentation du mannitol et aussi pour vérifier la mobilité de la souche à tester.

Mode opératoire : Il s'effectue par piqure centrale d'inoculum issue du tube sec contenant de l'eau physiologique, ensuite incubé à 37°C pendant 24 heures. Lorsque la bactérie fermente le mannitol, la coloration du milieu devient jaune et si la bactérie est mannitol négatif, le milieu reste inchangé. La diffusion des bactéries dans la gélose indique une mobilité de celles-ci. Lorsque les bactéries se développent uniquement au niveau de la piqure centrale, elles sont probablement immobiles.

Milieu Citrate de Simon (CS) : C'est un milieu qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie à partir des colonies pures issu du milieu, ensemencé puis incubé à 37°C dans l'étuve pendant 24 heures. L'utilisation du citrate se traduit par une coloration bleue du milieu. Si la bactérie n'utilise pas le citrate comme seule source de carbone, le milieu reste inchangé (coloration verte).

Sérotypage : Pour déterminer les sérotypes, l'extraction de l'ADN des souches a été faite. Après séquençage du génome, les séquences ont été nettoyées et assemblées. Celles-ci ont été soumises sur SeqSero qui est un outil de prédiction des sérotypes de salmonelle. SeqSero

a été développé par l'Université de Géorgie en 2015 et permet le sérotypage de *Salmonella*. Il est basé sur la recherche des gènes codant pour les antigènes O et H.

II.3.3. Méthode de formation de biofilm sur microplaque

La méthode est basée sur la technique décrite par **Stepanovic *et al.*** (2004) qui utilise un certain nombre de réactifs (**Annexe 1**). Les souches ont été cultivées sur gélose Trypticase Soja (GTS) et incubées pendant 24h à 37°C. Une colonie a été transférée dans un tube contenant 5 ml du bouillon Luria Bertani (LB). Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h et 48h.

Le lendemain 1,4 ml de milieu CFA (Colony Forming Antigen) a été ajouté dans un tube Eppendorf pour chaque souche à tester. Quatorze microlitres (14 µl) de la culture de nuit ont été ajoutés et le mélange est passé au vortex. Cent microlitres (100 µl) du mélange ont été inoculés dans chaque puit de la microplaque. Six puits ont été utilisés par souche étudiée. Le milieu CFA stérile a été utilisé comme témoin et introduit dans les puits aux alentours pour vérifier la stérilité. Après ces étapes, la plaque est incubée à 37°C pendant 24 heures. Le lendemain 25 µl de Crystal Violet 1% ont été ajoutés dans chaque puit, puis on laisse reposer sur la paillasse pendant 15 minutes. Les plaques sont rincées trois fois à l'eau distillée. Après séchage des plaques, celles-ci sont remplies de 200 µl d'acide acétique (33%). Le Crystal violet lié au biofilm est libéré par addition de l'acide acétique (33%) (**Annexe 2**).

L'absorbance a été lue en utilisant un lecteur de plaque ELISA (spectrophotomètre « IMark » couplé à un ordinateur intégré du logiciel Microplate Manager Software version 6.1) (**Figures 9 et 10**) à la longueur d'onde 595 nm.



Figure 9 : Spectrophotomètre

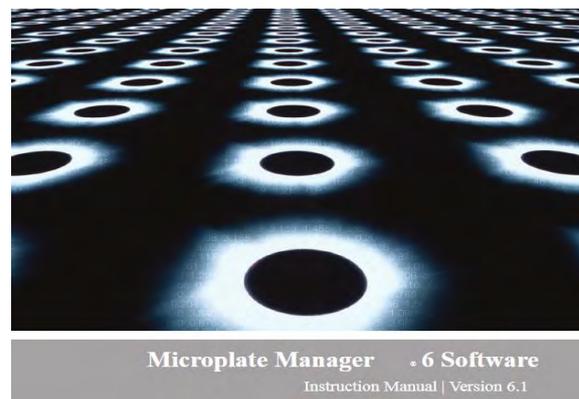


Figure 10 : Logiciel Microplate Manager Software

La densité optique, mesurée par spectrophotométrie à 595 nm, est proportionnelle à la quantité de biofilm formée. L'expérience a été répétée trois fois. La moyenne des ratios des DO a été calculée en faisant le rapport entre la moyenne de la DO lue et la moyenne de la DO de celle des témoins ou contrôles négatifs.

La Classification de la formation de biofilm selon les critères de **Stepanovic *et al.*** (2004) est basée sur les valeurs de DO obtenues pour les souches (**Tableau II**).

Tableau II : Classification de la formation de biofilm selon **Stepanovic *et al.*** (2004)

Moyenne des valeurs de DO	Formation de biofilm
$DO_{lue} \leq DO_{CN}$	Absence
$DO_{CN} < DO_{lue} \leq 2XDO_{CN}$	Faible
$2XDO_{CN} < DO_{lue} \leq 4XDO_{CN}$	Modérée
$DO_{lue} > 4XDO_{CN}$	Forte

CN : Contrôle Négatif

II.3.4. Test de sensibilité des bactéries du biofilm au chloramphénicol

Pour ce test de sensibilité, 16 souches de salmonelles ont été analysées, 7 formant un fort biofilm (AR6, AR8, AR9, AR10, AR13, AR14, AR34) et 9 formant un faible biofilm (AR5, AR12, AR20, AR26, AR28, AR39, AR40, AR41, AR42). Toutes ses souches étaient sensibles au chloramphénicol.

Après culture des souches sur bouillon LB, la méthode de formation de biofilm sur microplaque, décrite précédemment, a été réalisée. Le lendemain 100µl d'une solution de chloramphénicol à 10 µg/ml a été ajouté dans deux puits pour chaque souche à tester. Les puits sans antibiotique servent de témoin. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 1 heure.

Au temps indiqué, nous avons prélevé délicatement le liquide sans perturber le biofilm. Ensuite, nous avons ajouté 30µl de trypsine puis incubé pendant 5 minutes.

Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-4} ont été faites pour tous les puits qui contenaient du chloramphénicol et des dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} pour les puits témoins. Cent microlitre (100 µl) de la solution ont été étalés sur boîte SS et incubés pendant 24h à 37°C.

Les résultats sont rendus en écriture scientifique avec deux chiffres significatifs après le calcul suivant :

$$C = \frac{N}{V \times F} \text{ (Bactéries /ml)}$$

C : concentration bactérienne (bactéries / ml)

N : nombre de colonies comptées

V : volume de l'inoculum (en ml)

F : facteur de dilution

II.3.5. Analyses statistiques

Les données recueillies après lecture des microplaques au spectrophotomètre avec le logiciel Microplate Manager Software et du registre des patients ont été analysées avec le logiciel Rstudio Version 1.1.463 et les graphiques générés sur Excel version 2013. Pour les tests statistiques le seuil de significativité est fixé à 5%, l'intervalle de confiance est de 95%.

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Evaluation du potentiel de formation de biofilm après 24h d'incubation

La capacité des souches à former des biofilms a été évaluée en utilisant la technique du Crystal violet par la mesure de la densité optique (DO) à 595 nm au spectrophotomètre et les résultats correspondants sont présentés dans le **Tableau III**.

Tableau III : Formation de biofilm des souches de salmonelles après 24h d'incubation

Souches	Moyenne ratio DO 24H	Capacité de formation de biofilm
AR1	3,418	Modérée
AR2	1,327	Faible
AR3	4,149	Forte
AR4	4,101	Forte
AR5	1,924	Faible
AR6	5,762	Forte
AR7	4,720	Forte
AR8	4,224	Forte
AR9	5,188	Forte
AR10	4,843	Forte
AR11	3,717	Modérée
AR12	1,300	Faible
AR13	4,767	Forte
AR14	4,762	Forte
AR15	1,984	Faible
AR16	2,792	Modérée
AR17	1,403	Faible
AR18	2,526	Modérée
AR19	2,448	Modérée
AR20	1,070	Faible
AR21	3,390	Modérée
AR22	3,751	Modérée
AR23	6,495	Forte
AR24	3,862	Modérée
AR25	3,348	Modérée
AR26	1,862	Faible
AR27	2,423	Modérée
AR28	1,967	Faible
AR29	2,240	Modérée
AR30	2,949	Modérée
AR31	2,026	Modérée
AR32	1,676	Faible
AR33	2,249	Modérée
AR34	4,557	Forte
AR35	1,143	Faible

AR36	3,223	Modérée
AR37	3,079	Modérée
AR38	2,472	Modérée
AR39	1,079	Faible
AR40	1,153	Faible
AR41	1,065	Faible
AR42	1,753	Faible
AR43	1,754	Faible
AR44	3,120	Modérée
AR45	1,776	Faible
AR46	3,329	Modérée
AR47	1,807	Faible
AR48	3,754	Modérée
AR49	3,236	Modérée
AR50	3,630	Modérée

Nous remarquons que toutes les souches testées ont le potentiel à produire des biofilms (Ratio DO supérieur ou égal à 1). Néanmoins, le potentiel de formation varie entre les souches. Certaines souches ont une forte capacité de production de biofilms (25%) avec des ratios des DO supérieurs ou égale à 4. D'autres souches forment des biofilms modérés (43%) avec des ratios des DO compris entre 2 et 3, par contre les souches avec des ratios des DO compris entre 1 et 2 (32%) ont une faible capacité de production de biofilm par la technique du Crystal violet (**Figure 11**).

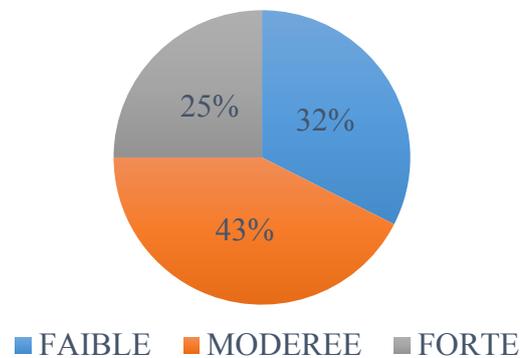


Figure 11 : Variation de la capacité de formation de biofilm après 24h d'incubation

III.1.2. Evaluation de la capacité de formation de biofilm après 48 H d'incubation

Tableau IV : Formation de biofilm des souches de salmonelles après 48 h d'incubation

Souches	Moyenne ratio DO 48H	Capacité de formation de biofilm
AR1	5,900	Forte
AR2	7,631	Forte
AR3	8,170	Forte
AR4	6,201	Forte
AR5	2,412	Modérée
AR6	5,836	Forte
AR7	7,148	Forte
AR8	6,452	Forte
AR9	5,805	Forte
AR10	3,995	Modérée
AR11	5,694	Forte
AR12	1,691	Faible
AR13	6,932	Forte
AR14	6,133	Forte
AR15	6,101	Forte
AR16	3,259	Modérée
AR17	1,276	Faible
AR18	4,284	Forte
AR19	5,055	Forte
AR20	1,459	Faible
AR21	5,549	Forte
AR22	4,994	Forte
AR23	6,706	Forte
AR24	5,063	Forte
AR25	4,901	Forte
AR26	3,301	Modérée
AR27	3,662	Modérée
AR28	3,657	Modérée
AR29	4,121	Forte
AR30	4,261	Forte
AR31	5,427	Forte
AR32	3,231	Modérée
AR33	3,393	Modérée
AR34	6,721	Forte
AR35	6,432	Forte
AR36	6,070	Forte
AR37	5,592	Forte
AR38	4,867	Forte
AR39	2,230	Modérée
AR40	1,387	Faible
AR41	7,418	Forte
AR42	2,333	Modérée

AR43	1,643	Faible
AR44	6,217	Forte
AR45	3,034	Moderée
AR46	2,785	Moderée
AR47	1,890	Faible
AR48	6,464	Forte
AR49	5,080	Forte
AR50	5,472	Forte

Après avoir testé la formation de biofilm des souches de salmonelles incubées pendant 48h, nous remarquons que toutes les souches avaient la capacité à produire un biofilm (**Tableau IV**). La plupart des souches présentaient une forte capacité de formation de biofilm (64%), alors que 24% formaient un biofilm modéré et 12% montraient une faible capacité de formation de biofilm (**Figure 12**). Cette plus forte capacité de formation de biofilm s'explique par la durée d'incubation plus longue qui permet un meilleur développement du biofilm.

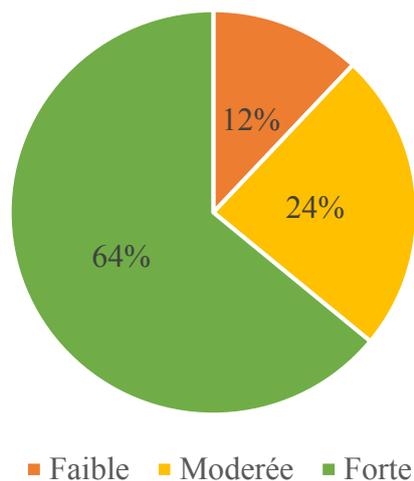


Figure 12 : Variation de la capacité de formation de biofilm après 48h d'incubation

III.1.3. Comparaison du potentiel de formation de biofilm après 24h et 48h d'incubation

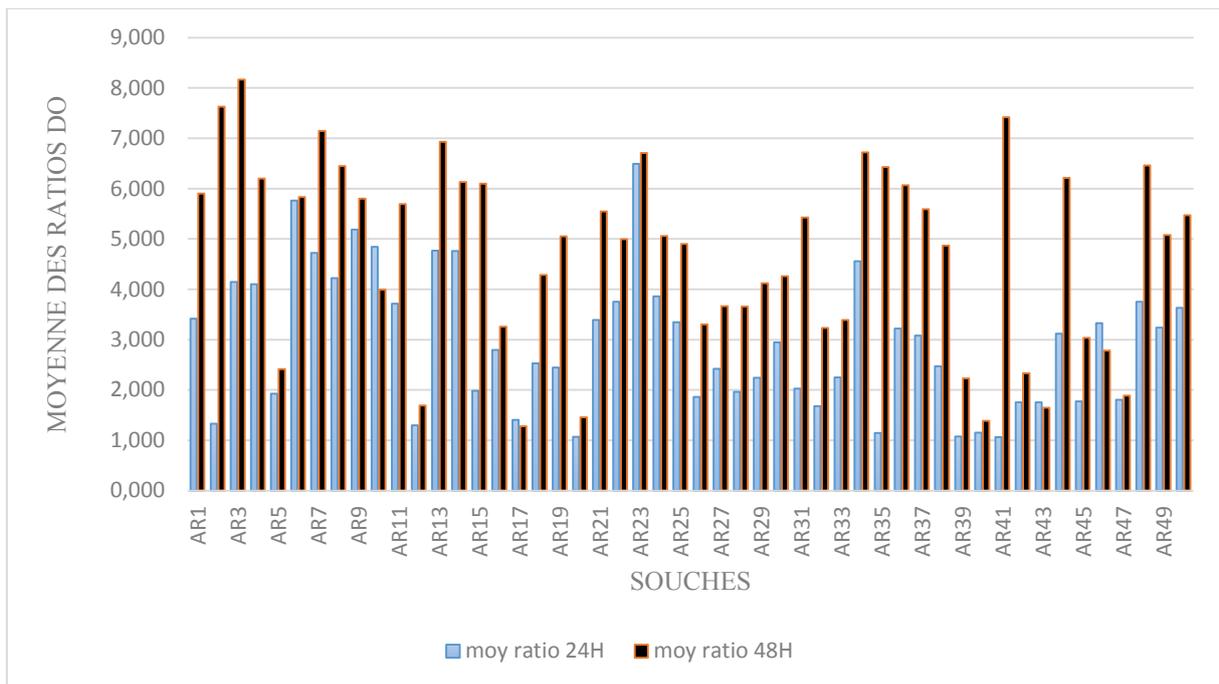


Figure 13 : Comparaison du potentiel de formation de biofilm après 24h et 48h d'incubation

L'analyse de ces résultats nous montre que la plupart des souches produisent plus de biofilm après 48h d'incubation qu'après 24h. Par contre, certaines souches présentent une augmentation modérée de biofilm après 48 h d'incubation (AR6, AR9, AR12, AR20, AR23, AR40, AR43, AR47), tandis que chez d'autres, cette augmentation est même inexistante (AR10, AR17) (**Figure 13**). Il ressort aussi de ces résultats que le nombre d'isolats de salmonelle ayant une forte capacité de formation de biofilm a aussi augmenté (**Figure 14**).

Toutefois considérant les deux distributions, la différence observée n'est pas statistiquement significative avec un p -value de 0,23.

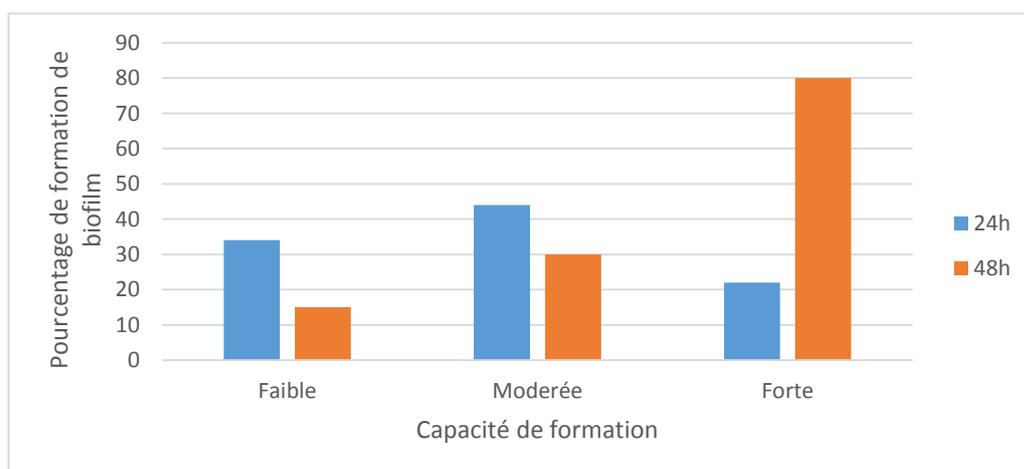


Figure 14 : Variation du potentiel de formation de biofilm après 24h et 48h d'incubation

III.1.4. Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction de l'origine des souches bactériennes

Les souches de salmonelles ont été obtenues à partir de différents échantillons biologiques : selles (20), pus (12), urines (6), sang (6), liquide céphalo-rachidien (3), et liquide pleural (2). Les souches de salmonelles ont été cultivées sur milieu LB et incubées à 24h, après quantification au Crystal violet et lecture, nous constatons que les souches provenant des selles formaient plus de biofilm que les autres avec des ratios de DO élevés pour la majorité d'entre elles. Par contre les souches provenant du sang formaient toutes un faible biofilm (**figure 15**).

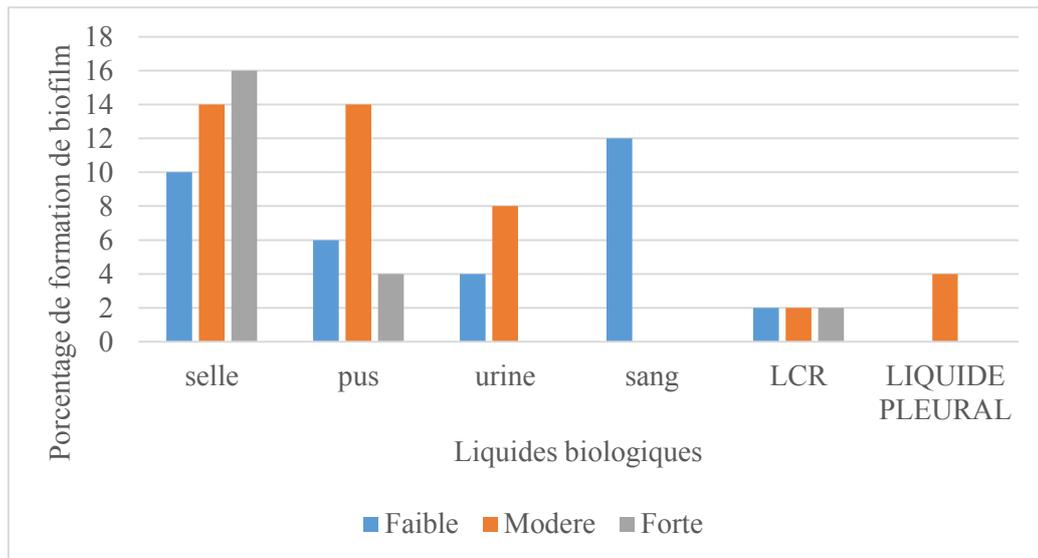


Figure 15 : Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction de l'origine des souches bactériennes

III.1.5. Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction du sérotype

Parmi les souches que nous avons étudiées, les sérotypes ont été déterminés pour 34 d'entre elles après séquençage du génome. Ces 34 souches appartiennent à 16 sérotypes (**Tableau V**). Le sérotype Enteritidis est le plus représenté avec 10 souches dont 8 formant un faible biofilm et 2 produisant un biofilm modéré. La majeure partie des sérotypes de SNT ont produit un biofilm modéré (47,1%). Par contre 35,3% ont présenté une faible capacité de former des biofilms et 17,6% une forte production de biofilm.

Tableau V : Evaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction des sérotypes

Souches	Sérotypes	Nombre	Biofilm		
			Faible	Modéré	Fort
1	<i>S. Enteritidis</i>	10	8	2	0
2	<i>S. Typhimurium</i>	5	1	4	0
3	<i>S. Chester</i>	4	1	2	1
4	<i>S. Colindale</i>	2	0	2	0
5	<i>S. Grumpensis</i>	2	0	2	0
6	<i>S. Albany</i> or <i>S. Dusseldorf</i>	1	0	0	1
7	<i>S. Brandenburg</i>	1	0	0	1
8	<i>S. Bredney</i>	1	0	0	1
9	<i>S. Give</i>	1	0	0	1
10	<i>S. Oranienburg</i>	1	0	0	1
11	<i>S. Johannesburg</i>	1	0	1	0
12	<i>S. Lille</i>	1	0	1	0
13	<i>S. Liverpool</i>	1	1	0	0
14	<i>S. Nottingham</i>	1	0	1	0
15	<i>S. Ralstonia</i>	1	1	0	0
16	<i>S. Virchow</i>	1	0	1	0
TOTAL		34	12 (35,3%)	16 (47,1%)	6 (17,6%)

III.1.6. Sensibilité des bactéries du biofilm au chloramphénicol

Les résultats du test ont montré que le biofilm de salmonelle serait résistant au chloramphénicol. Nous n'avons pas noté de différence majeure entre les souches avec une forte formation de biofilm et celles avec une faible formation. Seize (16) isolats de SNT qui formaient des biofilms divers et étaient tous sensibles au chloramphénicol ont été testés.

Les sept souches qui formaient un fort biofilm (AR6, AR8, AR9, AR10, AR13, AR14, AR34) présentaient toutes une croissance sur SS après avoir été testées avec le chloramphénicol pendant 1 heure.

Ces isolats ont des concentrations bactériennes diverses. En effet, les isolats AR6, AR10 et AR13 sont plus résistants au chloramphénicol avec des concentrations bactériennes élevées, respectivement $2,20 \cdot 10^4$ bactéries /ml, $9,00 \cdot 10^3$ bactéries /ml, $3,20 \cdot 10^4$ bactéries /ml.

Par contre, les autres isolats qui formaient un faible biofilm (AR5, AR12, AR20, AR26, AR28, AR39, AR40, AR41, AR42) ont aussi montré une croissance sur SS après un test au chloramphénicol. Les souches AR5, AR20, AR28, AR39 et AR41 résistent plus au chloramphénicol avec des concentrations bactériennes élevées, allant de $1,00 \cdot 10^4$ bactéries /ml à $1,70 \cdot 10^4$ bactéries /ml (**Tableau VI**).

Tableau VI : Résultats du test de sensibilité du biofilm au chloramphénicol

Souches	Concentration de bactérie(bactérie/ml)		Formation de biofilm	Origine biologique
	Sans chloramphénicol	Avec chloramphénicol		
AR6	2,00.10 ¹⁰	2,20.10 ⁴	Forte	Selles
AR8	2,70.10 ¹⁰	2,00.10 ³	Forte	Selles
AR9	6,50.10 ⁰⁹	3,00.10 ³	Forte	Selles
AR10	2,50.10 ¹⁰	9,00.10 ³	Forte	Selles
AR13	5,80.10 ⁹	3,20.10 ⁴	Forte	Pus
AR14	6,80.10 ⁹	7,00.10 ³	Forte	Pus
AR34	1,09.10 ¹⁰	2,00.10 ³	Forte	LCR
AR5	9,50.10 ⁹	1,00.10 ⁴	Faible	Selles
AR12	8,40.10 ⁹	5,00.10 ³	Faible	LCR
AR20	5,40.10 ⁹	1,70.10 ⁴	Faible	Sang
AR40	2,90.10 ⁹	5,00.10 ³	Faible	Pus
AR26	1,24.10 ¹⁰	5,00.10 ³	Faible	Selles
AR28	1,20.10 ⁹	1,20.10 ⁴	Faible	Sang
AR39	3,20.10 ⁹	1,00.10 ⁴	Faible	Urines
AR41	6,70.10 ⁹	1,10.10 ⁴	Faible	Sang
AR42	2,70.10 ⁹	8,00.10 ³	Faible	Sang

III.2. Discussion

Les bactéries peuvent adopter deux modes de vie différents : elles sont soit libres et isolées dans un milieu (état planctonique), soit attachées à une surface où elles vivent en communauté au sein du biofilm. Ce dernier est une structure complexe conférant aux bactéries une protection contre les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte. Ce qui constitue ainsi un réel problème de santé publique.

C'est dans ce contexte que nous avons mené cette étude qui a comme objectif de contribuer à la connaissance de la formation de biofilm chez les SNT.

Pour cela, nous avons étudié 50 isolats de SNT collectés au niveau du Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer de Fann.

Nous avons dans une première partie tester et comparer la capacité de ces isolats à former un biofilm. Ensuite nous avons comparé la formation de biofilm de ces SNT en fonction de la durée d'incubation afin de déterminer si ce facteur influait sur le potentiel de production de biofilm. Enfin, nous avons évalué la susceptibilité des SNT du biofilm au chloramphénicol en vue de vérifier si ce mode de vie conférait une protection aux bactéries du biofilm.

L'analyse des résultats a montré que les 50 isolats (100%) ont tous la capacité à produire un biofilm. Cependant, 32% des souches formeraient un faible biofilm, 43% un biofilm modéré et 25% une forte formation de biofilm. Des résultats similaires ont été rapportés (99,34%) par **Agarwal et al.** (2011), avec plusieurs sérotypes d'origine différentes. Ils ont enregistré une production de biofilm des isolats de salmonelles avec une capacité de formation diverse : 22,52% des souches formaient un faible biofilm, 57,61% un biofilm modéré et 19,21% une forte formation de biofilm.

Cette proportion observée sur la capacité de formation de biofilm des SNT pourrait être expliquée par la présence de structures particulières telles que les flagelles, les fimbriae (pili) et la production de substances polymériques extracellulaires. Ce qui pourrait favoriser le déplacement et l'adhérence des bactéries à une surface (**Donlan**, 2002).

Par ailleurs une proportion de formation de biofilm de salmonelle inférieure à la nôtre (93%) a été rapportée par **Stepanovic et al.** (2003) dont 27% formaient un faible biofilm, 50% un biofilm modéré, 17% un fort biofilm et 7% d'absence de biofilm. Cette différence pourrait s'expliquer par l'utilisation du bouillon de culture (BTS). Le biofilm produit avec le milieu LB était beaucoup plus important que celui produit avec le milieu BTS. Ceci pourrait être dû à la composition du milieu qui est aussi considérée comme un facteur important qui affecte la capacité des salmonelles à former un biofilm (**Agarwal et al.**, 2011).

En ce qui concerne la formation de biofilm des SNT en fonction de la durée d'incubation, notre étude a montré que celle-ci serait beaucoup plus importante après une incubation de la culture pendant 48h plutôt que pendant 24 heures.

Avec une p -value (Fisher's Exact Test) = 0,23 la différence observée entre les distributions étudiées n'était pas statistiquement significative. Nos résultats sont similaires avec une étude réalisée par **Agarwal et al.** (2011) sur différents sérotypes de salmonelle. Cette étude a montré que 48 heures était la durée d'incubation la plus efficace pour la formation de biofilm chez *salmonella spp.* Cette plus forte formation de biofilm pourrait s'expliquer par la durée d'incubation plus longue qui permet un meilleur développement du biofilm (**Agarwal et al.**, 2011).

Concernant l'évaluation du potentiel de formation de biofilm en fonction des liquides biologiques, nos résultats ont montré que les souches provenant des selles (souches non invasives) auraient plus la capacité à produire un biofilm que les autres souches provenant des autres liquides biologiques (souches invasives). Des résultats similaires ont été rapportés par **Mackenzie et al.** (2017) qui a montré que la plupart des souches invasives étaient incapables de former des biofilms. Ceci pourrait être expliqué par des mutations affectant les gènes régulant l'expression flagellaire et la motilité, diminuant ainsi l'attachement initial qui est une étape clé du processus de formation de biofilm (**Teplitki et al.**, 2006).

L'évaluation de la production de biofilm en fonction des sérotypes a montré que le sérotype Enteritidis aurait une faible capacité à produire un biofilm. **Agarwal et al.** (2011) ont trouvé des résultats différents chez le sérotype Enteritidis avec 80% des souches produisant un biofilm modéré et 20% avec une forte capacité de formation de biofilm. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que cette étude a utilisé des souches de *Salmonella* d'origine animale pouvant avoir un aspect génétique différent.

Concernant l'évaluation de la sensibilité des bactéries du biofilm au chloramphénicol, nos résultats ont montré que les seize (16) souches testées présentaient toutes une tolérance vis-à-vis de cet antibiotique. Cependant, les souches qui produisaient un fort biofilm et celles qui en formaient un faible, n'avaient pas une différence de tolérance majeure.

Nos résultats sont similaires à ceux d'une étude testant la sensibilité du biofilm de salmonelle au ciprofloxacine où le biofilm de salmonelle serait beaucoup plus résistant à cet antibiotique (**Gonzalez et al.**, 2018). De même, une étude menée sur les salmonelles isolées chez des enfants avec une gastroentérite montre que les isolats de *Salmonella enterica* étaient beaucoup plus résistantes aux antibiotiques lorsqu'elles sont en mode de vie biofilm (**Papavasileiou et al.**, 2010). Cette tolérance (ou résistance pour d'autres) des biofilms de salmonelle aux antibiotiques pourrait être expliquée par la présence d'un facteur très important qui est la matrice polymérique qui agirait comme une barrière réduisant la diffusion des agents antimicrobiens (**Lewis**, 2008).

Conclusion Perspectives et Recommandations

Il ressort de cette étude que 100% des isolats de SNT étudiées peuvent produire des biofilms sur une surface abiotique. Néanmoins, nous avons observé une grande diversité sur leur potentiel de formation de biofilm.

Nous avons pu montrer que la capacité des souches de SNT à former un biofilm était beaucoup plus importante après une incubation de la culture pendant 48 heures que pendant 24 heures.

Le test de sensibilité du biofilm au chloramphénicol a montré que ce mode de vie des bactéries conférait une protection contre les antibiotiques.

Lors de notre étude, nous avons constaté que les isolats de SNT provenant des selles produisaient plus de biofilm que les autres isolats provenant d'autres liquides biologiques tels que le sang, le liquide pleural, les urines, les pus et le LCR. Ce constat pourrait bien être confirmé avec une taille des échantillons beaucoup plus importante pour les souches de chaque liquide biologique.

Les résultats issus de cette étude permettront d'orienter la recherche, non pas seulement sur le mode de vie planctonique de la bactérie, mais aussi sur celui de biofilm. Ce qui permettra aux cliniciens d'adopter un traitement adéquat. L'éradication des biofilms pose des problèmes car les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques mais révèlent parfois une efficacité quasiment nulle sur les biofilms. Il est alors nécessaire de mettre en place des moyens adéquats afin de les éviter.

L'application des mesures d'hygiène et des recommandations concernant la manipulation des dispositifs médicaux constituent des mesures limitant le risque d'adhérence bactérienne initiale. Ainsi des études plus approfondies en augmentant la taille de l'échantillon seraient nécessaires. Des études sur les aspects moléculaires des biofilms pourraient aussi permettre une meilleure compréhension de ce mode de vie mais aussi mettre en évidence des fonctions et réponses physiologiques caractéristiques de cet environnement (échanges génétiques, adhésion, communication inter bactériennes, modalités de résistance aux antibiotiques).

En vue d'éliminer les biofilms, des études visant à brouiller la communication intercellulaire au sein du biofilm (quorum sensing) seraient aussi nécessaires pour une lutte plus efficace.

En ce qui concerne la tolérance ou résistance du biofilm aux antibiotiques, des études utilisant plusieurs antibiotiques de familles différentes avec des concentrations diverses permettraient de mieux consolider nos résultats.

La caractérisation de tels facteurs devrait fournir des pistes pour le développement de stratégies destinées à prévenir ou contrôler la formation de biofilms bactériens dans des situations où ceux-ci constitueraient un problème sanitaire, industriel ou écologique.

Références Bibliographiques :

1. **Abdelkader, A. S., Oumarou, S. S., Maârouhi, I. M., Ali, D. B., Yacoubou, B.** (2017). Prévalence et diversité de *Salmonella* en Afrique : Analyse qualitative et quantitative. *European Scientific Journal*, 13(30), pp. 250-270.
2. **Agarwal, R. K., Singh, S., Bhilegaonkar, K. N., Singh, V. P.** (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes, *International Food Research Journal*, 18(4), pp. 1493–1498.
3. **Ahmer, B. M. M. and Gunn, J. S.** (2011). Interaction of *Salmonella* spp. with the intestinal microbiota, *Frontiers in Microbiology*, 2, pp. 1–9.
4. **Aubry P., Gaüzère B.A.**, (2018). Les Salmonelloses, *Institut de Médecine Tropicale*, Université de Bordeaux, 6p.
5. **Beloin, C., Roux, A. and Ghigo, J.** (2008). *Escherichia coli* biofilms, *Microbiology and Immunology*, pp. 249–289.
6. **Bryers, J. D.** (2009). Biotechnology and Bioengineering: Introduction, *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), pp. 309–347.
7. **Chicurel, M.** (2000). Slimebusters. *Nature*, 408, pp.284–286.
8. **Clutterbuck, A.L., Woods, E.J., Knottenbelt, D.C., Clegg, P.D., Cochrane, C.A., Percival, S.L.** (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121(1-2), pp. 1–17.
9. **Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P.** (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, pp. 1318–1322.
10. **Donlan, R. M.** (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp. 881–890.
11. **Ghasemmahdi, H., Tajik, H., Moradi, M., Mardani, K., Modaresi, R., Badali, A., Dilmaghani, M.** (2015). Antibiotic resistance pattern and biofilm formation ability of clinically isolates of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *International Journal of Enteric Pathogens*, 3(2), pp. 1-6.
12. **Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T.** (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology*, 7(6), pp. 894–906.
13. **González, J. F., Alberts, H., Lee, J., Doolittle, L. & Gunn, J. S.** (2018). Biofilm Formation Protects *Salmonella* from the Antibiotic Ciprofloxacin in Vitro and in Vivo in the Mouse Model of chronic Carriage. *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–8.
14. **Grimont P.A.D., Grimont F., Bouvet P,** (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: **Wray C., Wray A.** (2000), *Salmonella* in domestic animals. *CABI Publishing*, pp. 1-17.
15. **Grimont P.A.D., Weill F.X.** (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella* serovars. 9th edition. Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche sur les *Salmonella*, 166p.
16. **Korsak, N., Clinquart, A. and Daube, G.** (2004). *Salmonella* spp dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique, 148, pp. 174–193.
17. **Lebrazi S.,** (2011). Evaluation de la contamination de la filière avicole par *Salmonella* spp. Mémoire de fin d'études, Biotechnologies Microbiennes, Fès : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, 81p.
18. **Lewis, K.** (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Microbiology and Immunology*, 322, pp. 107–131.

19. **MacKenzie, K. D., Palmer, M. B., Köster, W. L., White, A. P.** (2017). Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic *Salmonella* strains to colonize multiple host species, *Frontiers in Veterinary Science*, **4**, pp. 1–19.
20. **Michael Dunne Jr., W.** (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, **15**(2), pp. 155–166.
21. **Le Minor, L.** (1992). Taxonomie et nomenclature des *Salmonella*. *Medecine et Maladies Infectieuses*, **22**(3), pp. 246–248.
22. **Papavasileiou, K., Papavasileiou, E., Tseleni-Kotsovili, A., Bersimis, S., Nicolaou, C., Ioannidis, A., Chatzipanagiotou, S.** (2010). Comparative antimicrobial susceptibility of biofilm versus planktonic forms of *Salmonella enterica* strains isolated from children with gastroenteritis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **29**(11), pp. 1401–1405.
23. **Prouty, A. M. and Gunn, J. S.** (2003). Comparative analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, **71**(12), pp. 7154–7158.
24. **Roux, A. and Ghigo, J.-M.** (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, (1), pp. 261-268.
25. **Rycroft A.N.** (2000). Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella* in: **Wray C., Wray A.** (2000), *Salmonella* in domestic animals. *CABI Publishing*, pp.1-17.
26. **Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *Society*, **184**(4), pp. 1140–1154.
27. **Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J.** (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, **45**(2), pp. 502–531.
28. **Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović, M.** (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella spp.* *Food Microbiology*, **20**(3), pp. 339–343.
29. **Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M.** (2004). Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, **38**(5), pp. 428–432.
30. **Sutherland, I. W.** (2001). The biofilm matrix: An immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, **9**(5), pp. 222–227.
31. **Teplitski, M., Al-Agely, A., Ahmer, B.M.M.** (2006). Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, **152**(11), pp.3411–3424.
32. **Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., Euzéby, J.P.** (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**(1), pp. 521–524.
33. **Tolker-Nielsen, T. and Molin, S.** (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*, **40**(2), pp. 75–84.
34. **Van Houdt, R. and Michiels, C. W.** (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, **156**(5–6), pp. 626–633.

35. **Weill, F-X.** (2008). Salmonelles non-typhiques d'origine animale et résistance aux antibiotiques, *Bull. Acad. Vét. France*, 161 (3), pp. 221–234.

36. **Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P.** (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Nature*, 413, pp. 860–864.

Sites Web consultés

1- *Salmonella enterica* (www.medecinesciences.org) consulté le 14/10/2019

2 -Image montrant Logiciel Microplate Manager Software (<http://www.manualsdir.com>) consulté le 15/01/2020

3- Image montrant le spectrophotomètre (<http://www.manualsdir.com>) consulté le 15/01/2020

4- Image montrant microplaque 96 puits (<https://www.fishersci.be/shop/products>) consulté le 18/02/2020)

5- Sansonetti P. (2018). Infections chroniques et récurrentes. Séminaire, COLLEGE DE France (disponible sur www.college-de-france.fr/site/philippe-sansonetti/course-2018-12-19-16h00.htm) consulté le 15/04/2020

6 - Delorme L (2012). Biofilms : nouvelle approche dans la guérison des plaies (En ligne). Disponible sur www.oiiq.org/sites/default/files/uploads/pdf/ consulté le 02/09/2020

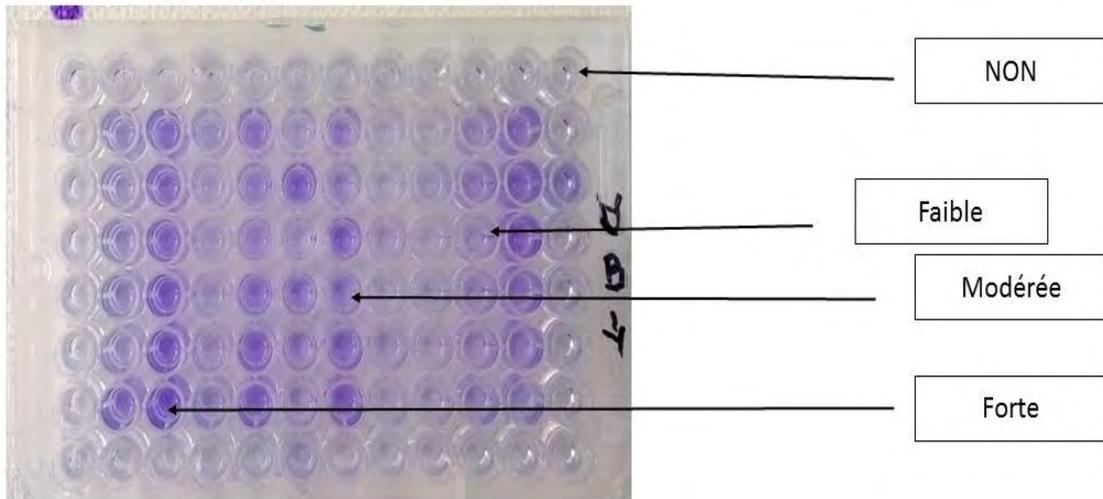
Annexes

Annexe 1 : Tableau I : Liste des consommables regroupant les réactifs et les non réactifs

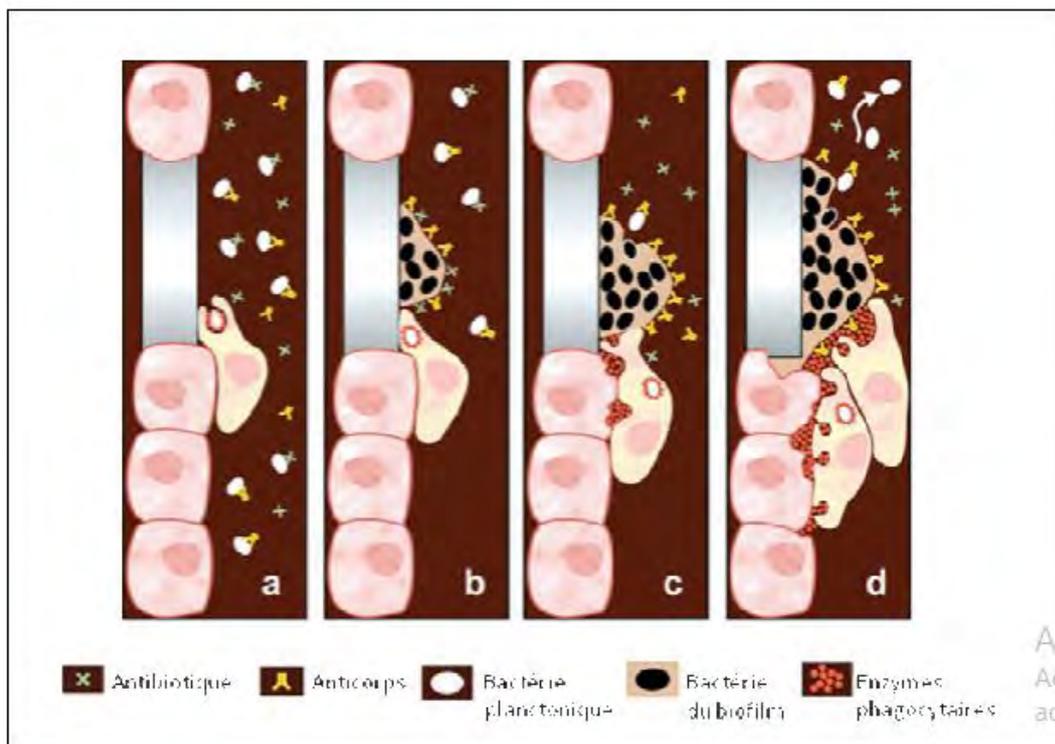
Les réactifs	Les non réactifs
<ul style="list-style-type: none">• Le Crystal violet 1%• L'acide acétique 33%• CFA medium (Colony Forming Antigen)<ul style="list-style-type: none">✓ 10g Casamino acid✓ 1,5g d'extrait de levure✓ 50mg MgSO4✓ 5mg MnCl2• La poudre au chloramphénicol• Les disques d'antibiotiques• Eau physiologique 0,9% NaCl• Eau distillée stérile• La trypsine• Les boîtes de cultures	<ul style="list-style-type: none">• Les paires de gants• Les pipettes pasteurs• Papier cleanex• Les microplaques• Les écritoirs• Les EPI• Les portoirs

Tableau II : Liste des non consommables

Les non consommables
<ul style="list-style-type: none">• Les étuves• Le spectrophotomètre• Agitateur• Les tubes Eppendorf• Les tubes Falcon



Annexe 2 : Quantification de biofilms sur microplaque 96 puits



Annexe 3 : Mécanisme de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte (Costerton, 1999)

Annexe 4 : Composition de la matrice du biofilm (Sutrerland, 2001)

Componet	% of matrix
Water	up to 97%
Microbial cells	2-5% (many species)
Polysaccharides (homo and heteropolysaccharides)	1-2% (neutral and polyanionic)
Proteins (extracellular and resulting from lysis	<1-2% (many, inclyding enzymes)
DNA and RNA	<1-2% (from lysed cells
Ions	(bound and free)

ETUDE COMPARATIVE DE LA FORMATION DE BIOFILM PAR DES SOUCHES CLINIQUES DE SALMONELLES NON TYPHIQUES

Nature du mémoire : Diplôme de Master en Biologie Animale Spécialité : **Parasitologie**

Nom du candidat : El Hadji Aly NIANG né le 30/04/1995 à Khombole

Membres du Jury

Président : Mr Ngor FAYE Maître de Conférences FST/UCAD

Membres : Mr Yakhya DIEYE Maître-Assistant ESP/IPD

Mr Arfang DIAMANKA Maître-Assistant FST/UCAD

Mr Malick FALL Maître de conférences FST/UCAD

Résumé :

Notre étude porte sur la formation de biofilm par des souches cliniques de salmonelles non typhiques. Elle a pour objectif de contribuer à la connaissance de la formation de biofilm chez les salmonelles non typhiques.

L'étude a été réalisée sur un échantillon de 50 isolats de salmonelles non typhiques provenant de liquides biologiques différents (selles, pus, sang, urines, liquide céphalo-rachidien et liquide pleural), collectés au Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR).

Toutes les souches testées avaient la capacité de former un biofilm : 32% des souches formaient un faible biofilm, 43% un biofilm modéré et 25% une forte formation de biofilm.

La capacité des souches de SNT à former un biofilm était beaucoup plus importante après incubation de la culture pendant 48h que pendant 24 heures.

Pour la tolérance du biofilm au chloramphénicol, une différence majeure n'a pas été notée entre les souches formant un faible biofilm et celles qui avaient une forte formation. Les résultats issus de cette étude permettront d'orienter la recherche, non pas seulement sur le mode de vie planctonique de la bactérie, mais aussi sur celui de biofilm ce qui permettra aux cliniciens d'adopter un traitement adéquat.

Mots clés : Biofilm, *Salmonella* non typhique, Chloramphénicol

Abstract

Our study focuses on biofilm formation by clinical strains of non-typical *Salmonella*. The aim of this study is to contribute to the knowledge of biofilm formation in non-typical *Salmonella*. The study was carried out on a sample of 50 strains of non-typical *Salmonella* from different body fluids (stool, pus, blood, urine, cerebrospinal fluid and pleural fluid), collected at the National Children's Hospital Albert Royer (CHNEAR).

All strains tested had the ability to form a biofilm: 32% of the strains formed a low biofilm, 43% a moderate biofilm and 25% a high biofilm formation.

The ability of SNT strains to form a biofilm was much greater after incubation of the culture for 48 hours than for 24 hours.

For the tolerance of the biofilm to chloramphenicol, there wasn't a major difference between the strains forming a low biofilm and those having a high biofilm formation.

The results of this study will guide the research not only on the planktonic lifestyle of the bacterium but also on the biofilm lifestyle, which will allow clinicians to adopt an appropriate treatment.

Key words: Biofilm, non-typical *Salmonella*, Chloramphenicol