

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M<sup>ELLE</sup> HATTOU SOUMIA

M<sup>ELLE</sup> BRAHIMI HAYET

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET  
APPLIQUÉE**

THÈME

**Etude de l'effet inhibiteur de l'acide salicylique  
sur l'adhérence et la croissance planctonique de  
*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus***

Soutenue publiquement le 13 /06/2016

DEVANT LE JURY :

Président	Mr MEKHALDI .A	Pr U Mostaganem
Encadreure	Mme REBAI. O	M.C.A U Mostaganem
Co-encadreur	Mlle BELKACEM. I	Doctorante U Mostaganem
Examineur	Mr DJIBAOUI .R	M.C.A U Mostaganem

# *Remerciements*

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements au Bon DIEU qui nous donne le courage et la volonté d'achever ce modeste travail.*

*Nous remercions Melle BELKACEMI IMANE et Mme REBAI Ouafa d'avoir accepté de nous encadrer, pour leurs orientations pour élaborer ce modeste travail.*

*Nous remercions les membres de jury pour avoir fait l'honneur de juger ce travail.*

*Nous remercions Mr HAMOUM HAKIM pour son aide ; nous remercions aussi Mr Mohamed pour son accueil au niveau laboratoire de microbiologie*

*Nous remercions tous les enseignants de la faculté de sciences et de la nature et de la vie.*

*Enfin, nous avons une pensée spéciale à tous ceux qui ont contribué de divers efforts à l'aboutissement de ce travail, qu'ils en soient remerciés.*

# Sommaire

- Dédicaces
- Remerciements
- Résumé
- Abstract
- Résumé en langue arabe
- Liste des tableaux
- Liste des figures
- Liste des abréviations

## Tableau de matière

- Introduction.....01

## Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Toxi-infection alimentaire

- 1- Toxi-infection alimentaire.....03
  - 1.1- Définition . .....03
- 2- Les souches bactériennes étudiées .....03
  - 2.1- *Staphylococcus aureus*.....03
    - 2.1.1- Généralités .....03
    - 2.1.2- Taxonomie... .....04
      - 2.1.2.1- Historique ... .....04
      - 2.1.2.2- Habitat .....04
    - 2.1.3- Caractéristique et identification *Staphylococcus aureus* .....05
    - 2.1.4- Pouvoir pathogène .....05
  - 2.2. *Bacillus cereus*.....06
    - 2.2.1. Généralités .....06
    - 2.2.2 Historique.....06
    - 2.2.3 Habitats.....06
    - 2.2.4 Caractéristiques et taxonomie .....07

2.2.5. <i>Bacillus cereus</i> agent indésirable en industrie agroalimentaire.....	07
---	----

2.2.5.1. <i>Bacillus cereus</i> responsable de TIA et de TIAC.....	07
--	----

## Chapitre II : Les biofilms bactériens

1. Biofilm.....	09
1.1. Généralités.....	09
1.2. Définition .....	09
1.3. Les principaux constituants du biofilm.....	10
1.4. Formation des biofilm.....	11
1.4.1. Conditionnement de surface.....	11
1.4.2. Transport et déplacement.....	12
1.4.3. Adhésion réversible.....	12
1.4.4. Adhésion irréversible.....	13
1.4.5. Maturation.....	13
1.4.6. Dispersion.....	14
1.5. Le Quorum Sensing.....	15
1.5.1. Définition.....	15
1.6. Biofilm dans le domaine agroalimentaire.....	16

## Chapitre III :Acide salicylique

1. Historique.....	17
2. Définition de l'acide salicylique.....	17
3. Propriétés physico-chimique.....	18
4. Structure et biosynthèse de l'acide salicylique.....	18
5. Le mode d'action de l'acide salicylique.....	20
6. Résistance Systémique Induite.....	21
7. Effet de l'Acide Salicylique sur la formation de biofilm par <i>S.aureus</i> et <i>B.cereus</i> .....	21

## Etude expérimentale

### Chapitre IV : Matériel et Méthodes

1. Obtention des souches bactériennes.....	22
2. Cinétique de croissance des souches bactériennes au cours de formation du biofilm bactérien.....	22
3. Formation des biofilm bactériens.....	23
3.1. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction du temps d'incubation.....	23
4. Détermination de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique des souches bactériennes étudiées.....	24
5. L'étude de l'effet d'acide salicylique sur la formation de biofilm de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25

### Chapitre V : Résultats et discussion

1. Cinétique de croissance bactérienne de <i>B.cereus</i> et <i>S.aureus</i> au cours de formation du biofilm bactérien.....	26
2. Evaluation de la biomasse adhéree par la méthode Cristale Violet (CV).....	29
3. Etude de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance et l'adhérence de <i>B.cereus</i> et <i>S.aureus</i> .....	31
3.1. Détermination de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique des souches bactériennes étudiées.....	31
3.2. Etude de l'effet d'acide salicylique sur la formation de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
- Conclusion.....	35
- Références bibliographique.....	36
- Annexes	





## LISTE DES TABLEAUX

### Tableau N° :

- 01- Classification de *Staphylococcus aureus* d'après (**Pasteur, 1877**).....03
- 02- Classification de *Bacillus cereus* d'après (**Pasteur, 1877**).....06

## LISTE DES FIGURES

### Figure N° :

01 - Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> (Grx 100).....	04
02 - Schéma représente les composants d'un biofilm (tel que : surface, cellules bactériens, EPS « exopolysaccharides ») ( <b>Cerning., 1990</b> ).....	10
03 - Observation microscopique d'un biofilm de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> au microscope électronique à balayage.....	11
04 - Représentation schématisée des principales étapes de la formation d'un biofilm a partir de cellule planctonique (mobile) ( <b>Stoodley et al., 2002</b> ).....	15
05 - La synthèse de l'acide salicylique par la réaction de Kolbe ( <b>Giberneau et Brabé, 2007</b> ).....	18
06 - Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique ( <b>Lee et al., 1995 ; Wildermuth et al., 2001</b> ).....	19
07 - Evaluation de la cinétique de croissance des isolats bactériens de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i> au cours de formation de biofilm.....	23
08 - Diagramme représentant l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique et l'adhérence de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i> .....	24
09 - Protocole de quantification de la formation de biofilm ( <b>Djordjevic, 2002</b> ).....	25
10 - Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de <i>Bacillus cereus</i> au cours de formation de biofilm.....	26
11 - Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de <i>Staphylococcus aureus</i> au cours de formation de biofilm.....	27
12 - Evaluation de la biomasse adhérente de <i>Bacillus cereus</i> au cours de formation de biofilm.....	29
13 - Evaluation de la biomasse adhérente de <i>Staphylococcus cereus</i> au cours de formation de biofilm.....	29
14 - Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de <i>Bacillus cereus</i> .....	31

15 - Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
16 - Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de <i>Bacillus cereus</i> .....	33
17 - Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33

## **Introduction**

De très nombreux organismes des milieux terrestres et aquatiques forment des associations attachées à un support, qui peut être une plante ou un élément du sol. Le résultat est un biofilm qui peut se définir comme le développement d'une population de microorganismes adhérents à un support et consolidés par un ciment commun (**Jouenne., 2008**).

La mise en évidence de ces biofilms est longtemps restée anecdotique, en partie parce que les méthodes d'observations n'étaient pas suffisamment performantes. Dès 1973, Characklis mit en évidence des agrégats microbiens provenant de circuits d'eaux industrielles et qui étaient hautement résistants aux désinfectants. En 1978, Costerton et Col proposèrent les premières hypothèses sur les mécanismes d'adhésion des micro-organismes. Depuis, un nombre croissant d'études ont été consacrées aux biofilms, aussi bien dans le domaine industriel que dans le domaine médical (**Phillips, 2011**). Les biofilms bactériens jouent un rôle majeur dans plus de 80% des infections. *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont deux bactéries susceptibles d'entraîner des maladies, les TIA (toxi infections alimentaires), ou intoxication, qui sont dues au développement des toxines : ceurolides, entérotoxine... et les MIA (Maladies Infection Alimentaire), qui sont dues au développement des bactéries dans l'organisme, après ingestion d'un aliment contaminé.

Compte tenu de cette importance biologique des biofilms, la présente thématique constitue une contribution à l'étude de la formation des biofilms in vitro. A cet effet, le travail pencherait sur la mise en place d'un protocole permettant d'observer, la formation de biofilms par deux souches pathogènes. L'élimination du biofilm par l'acide salicylique en tant que agent inhibiteur serait aussi examinée.

Notre travail, dans une première partie, englobe une recherche bibliographique qui comporte deux chapitres :

Dans le premier chapitre on a la présentation sur les biofilms, les étapes de formation des biofilms, les exopolysaccharides, et le lien entre Quorum Sensing, biofilm et infection à *S.aureus* et *B.cereus* .

Alors que le deuxième chapitre présente une généralité sur l'acide salicylique, la structure et la biosynthèse, mode d'action, rôle physiologique, et effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par *S.aureus* et *B.cereus*.

Le but de notre travail consiste à :

- Obtention et confirmation des isolats testées.
- Suivre la cinétique de la formation de biofilm de ces bactéries *S.aureus* et *B.cereus*..
- L'étude de l'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par *S.aureus* et *B.cereus*.

## 1. Toxi-infection alimentaire

### 1.1. Définition

Les toxi-infections alimentaires sont soit des intoxications soit des infections qui résultent de la consommation d'aliments contaminés par des toxines produites par des micro-organismes spécifiques ou par la présence de micro-organismes infectieux. Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire. Elle est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

*Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Shigella* et *Bacillus cereus* sont les principales bactéries responsables de toxi-infections alimentaires liées à la présence de la bactérie dans l'aliment (Hugas *et al.*, 2002). Les symptômes apparaissent plus 12 h après l'ingestion de l'aliment contaminé, suite au développement de la bactérie dans l'organisme et, dans certains cas, à la production de toxines. A l'inverse, l'apparition de symptômes suite à une intoxication alimentaire est très rapide (quelques heures) car elle est liée à la consommation de toxines préalablement produites par la bactérie dans l'aliment (INVS, 2011).

### 2. Les souches bactériennes étudiées

#### 2.1. *Staphylococcus aureus*

##### 2.1.1. Généralités

*Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène capable de provoquer diverses maladies chez l'homme ainsi que chez l'animal domestique. chez l'homme, *S. aureus* peut causer, soit des infections mineures de la peau ou des muqueuses, soit des infections sévères, associés ou non à des septicémies, telles que des pneumonies, des endocardites, l'ostéomyélite, le syndrome du choc toxique, etc (Lowy, 1998).

**Tableau 1** : Classification de *Staphylococcus aureus* d'après (Pasteur, 1877).

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Division</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Classe</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Famille</b>	<i>Staphylococcaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>Espèce</b>	<i>aureus</i>

## 2.1.2. Taxonomie

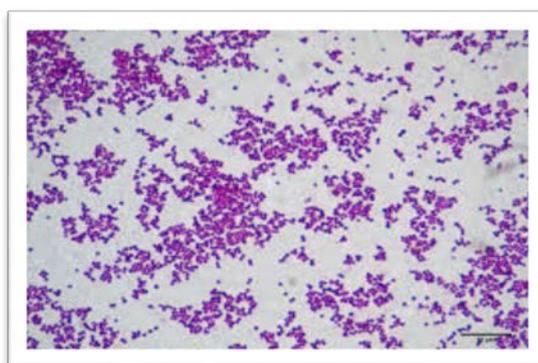
### 2.1.2.1. Historique

Staphylocoques ont été l'objet de nombreuses investigations menées par d'éminents microbiologistes à l'instar de KOCH, PASTEUR, OGSTON et ROSENBAACH. En 1878, KOCH souligne le rôle pathogène de bactéries se présentant sous forme de cocci Gram positif. Ces cocci seront ensuite isolées puis identifiés d'un pus par Louis Pasteur en 1880. Ils seront baptisés en 1883 par Ogston sous le nom de *staphylocoques*, du latin « *staphylle* » ou grappe et coccus ou « grain ». En 1884, ils sont classés en fonction de la pigmentation des colonies par ROSENBAACH en *Staphylococcus aureus* du latin « orange » et *Staphylococcus albus*, du latin « blanche ».

### 2.1.2.2. Habitat

Le réservoir naturel des *staphylocoques* est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement (air, eaux et sol).et vivent à l'état commensale sur la peau et les muqueuses des organismes humains et d'animaux.

Le site de colonisation préférentielle de *Staphylococcus aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale et à partir de ces sites de portage, il colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides (aisselle,périnée) et les mains (**Fasquelle, 1968**).



**Figure 1** : Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* (Grx 100)

### 2.1.3. Caractéristique et identification *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est un coque à gram positif de 0,5 à 1 µm de diamètre, non sporulés, parfois encapsulés, immobile, aéro- anaérobie facultatif, possédant une catalase-positives et oxydase –négatives, isolés ou groupés en amas, *S.aureus* est identifié sur l’aspect pigmenté des colonies, la positivité des tests de coagulation et d’agglutination. Appartient au genre *Staphylococcus* phylogénétiquement proche des genres *Enterococcus*, *Bacillus* et *Listeria*. Dont certains sont subdivisées en 2 sous-espèces : *S. aureus subsp.* Anaérobiose. Cette dernière, isolée en 1985 à partir d’abcès chez les moutons, est anaérobie et peu connue (**Brun et Bes, 2000**).

### 2.1.4. Pouvoir pathogène

C’est le plus régulièrement pathogène, d’origine humaine, animale (volaille, bovin, ovin, caprin...), environnementale ou non spécifique (**Delarras, 2007**). C’est une bactérie présente chez les humains, lesquels sont à 95% responsables des contaminations alimentaire. 50% des humains sont porteurs de ce germe (cavité nasale), ceci même chez un individu en santé. On peut la retrouve en particulier dans les préparations alimentaires à cause d’un manque d’hygiène du personnel (porteur sain ou blessures). Il se retrouve facilement dans les aliments (**Liesse, 2012**).

La présence de *S.aureus* dans les aliments constitue un risque pour la santé humaine parce que certains souches sont capables de produire des entérotoxines (protéines globulaires de poids moléculaire 25000-28000 Dalton) dont l’ingestion provoque une intoxication (**Afssa, 2009**). Cette bactérie peut provoquer la *staphylococcitose* rarement mortelle chez l’homme (**Delarras, 2007**).

#### ➤ Toxines

Les intoxications à *S. aureus* (la plus fréquente) sont plus répandues que celles des *Clostridium botulinum*. L’entérotoxine est produite dans chacune des phases de croissance de la bactérie. Elle présente une grande thermorésistance malgré que *S.aureus* soit détruite par un traitement de pasteurisation. Même les traitements Ultra Hight Température (U.H.T) (143°C /10<sup>1/2</sup>) n’activent pas les toxines, généralement, les symptômes indicateurs d’une intoxication par *S. aureus* sont les suivantes : période d’incubation de quelques heures ; les entérotoxines agissent au niveau des nerfs du tube digestif qui stimulent le centre des

vomissements ; douleurs abdominales ; diarrhées ; crampes. On parle souvent de gastroentérites dues aux *Staphylococcies* (Afssa, 2009).

## 2.2. *Bacillus cereus*

### 2.2.1. Généralités

Le groupe *Bacillus cereus* sensu lato, est constitué de six espèces taxonomiquement très proches: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus mycoïdes*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis*. Ce groupe appartient à la famille des *Bacillaceae* (section 13 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology). Ce sont des bacilles à coloration de Gram positive, généralement mobiles par ciliature péritriche ou immobiles, produisant des endospores.

La plupart des bacilles sont d'une totale innocuité vis-à-vis des organismes vivants, *B. cereus sensu stricto* communément appelé *B. cereus*, est un pathogène opportuniste émergent, généralement associé à des toxi-infections alimentaires ou à des infections locales de l'œil et du parodonte (EFSA, 2005).

**Tableau 2:** Classification de *Bacillus cereus* d'après (Pasteur, 1877).

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Division</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Classe</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Famille</b>	<i>Bacillaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Espèce</b>	<i>cereus</i>

### 2.2.2 Historique

*Bacillus cereus* fut isolé pour la première fois par Frankland en 1887 au Royaume Uni, à partir de l'air d'une étable. Cette souche dénommée ATCC 14579 est considérée comme la souche type de *Bacillus cereus* (Hauge, 1995).

### 2.2.3 Habitats

Les *Bacillus* sont ubiquitaires car leurs spores leur confèrent une grande résistance. On en trouve dans les sols qui constituent le principal réservoir, dans l'eau de mer, dans l'eau douce

et sur les plantes. On en trouve également dans les aliments, et même dans les produits « stérilisés » alimentaire ou médicamenteux à cause de la thermorésistance des spores (Guinebretière *et al.*, 2008).

#### 2.2.4 Caractéristiques et taxonomie

*Bacillus cereus* aussi appelé *Bacillus cereus sensu stricto* (ss) fait partie morphologiquement et de part sa phylogénie à un groupe de bactéries que l'on nomme : groupe *B.cereus* ou *B. cereus sensu lato*. Outre les caractères généraux du genre *Bacillus*, les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont des bacilles de grande taille ( $> 1.0 \mu\text{m}$ ) à Gram positif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils se distinguent des autres *Bacillus* essentiellement par leur aptitude à croître en anaérobiose.

Les espèces du groupe *cereus* sont très répandues dans la nature et sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface des végétaux, ce qui favorise leur propagation dans les aliments. Certaines espèces sont aussi capables d'infecter des mammifères et /ou des insectes (Drobniewski 1993 ; Kotiranta *et al.*, 2000). La capacité à produire des spores leur permet de résister à des environnements extrêmes tels que la pasteurisation ou l'acidité rencontrée dans l'estomac mais aussi à adhérer aux matériaux utilisés au cours de la chaîne de fabrication des plats cuisinés (Lequette *et al.*, 2011 ; Mols & Abee, 2011 ; Ceuppens *et al.*, 2012). La gamme de température de croissance varie en fonction des souches et s'étend de 5°C à 50°C. Outre sa capacité à produire des spores, *B.cereus* est aussi reconnu comme difficile à éradiquer à cause de la formation de biofilm (Hauge, 1995).

#### 2.2.5. *Bacillus cereus* agent indésirable en industrie agroalimentaire

##### 2.2.5.1. *Bacillus cereus* responsable de TIA et de TIAC

Il a été montré que *B. cereus* fait partie des 4 plus importantes causes d'intoxication alimentaire commune (TIAC) en France (Albert *et al.*, 2009), c'est une toxi-infection alimentaire collective définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire au groupe. Les *Bacillus cereus* peuvent provoquer soit des vomissements soit des symptômes diarrhéiques par le biais de deux types de toxines: respectivement la cereulide et des toxines entériques.

➤ **La cereulide**

La cereulide est un dodéca de psipeptide c'est à-dire une structure cyclique composée d'une alternance de 12 acides aminés et d'ester . D'après Kotiranta *et al* (2000) cette enzyme ne perd son activité jusqu'à une température de 121°Celle tolère des pH compris entre 2 et 11 et enfin elle est stable après traitement à la pepsine et trypsine. Lorsqu'elle est ingérée, la cereulide provoque un syndrome émétique. Les premiers vomissements peuvent apparaître dans la demi-heure suivant l'ingestion du produit contaminé. A la différence des entérotoxines, la cereulide est directement produite dans les aliments lorsque les bactéries sont dans leur phase de croissance stationnaire ou de sporulation (**Drobniewski, 1993**). Selon Guinebretière (2008) les bactéries capables de produire la cereulide fait parties du groupe III.

La cereulide est toxique pour les mitochondries en entraînant la perméabilisations des membranes aux ions potassium. Cependant, le syndrome émétique semble lié à l'implication d'un récepteur à la sérotonine 5-HT3 .

➤ **Les entérotoxines**

Il existe trois types de toxines produites par *B. cereus* capables d'induire des syndromes diarrhéiques: la Nhe (entérotoxine non hémolytique), Hbl (Hémolysine BL) et Cyt K (cytotoxine K).Ces entérotoxines impliquées dans des TIAC sont produites lors de la phase de croissance végétative des *B. cereus* dans le petit intestin de la personne contaminée (**Weigel et al., 2003**).

## 1. Biofilm

### 1.1. Généralités

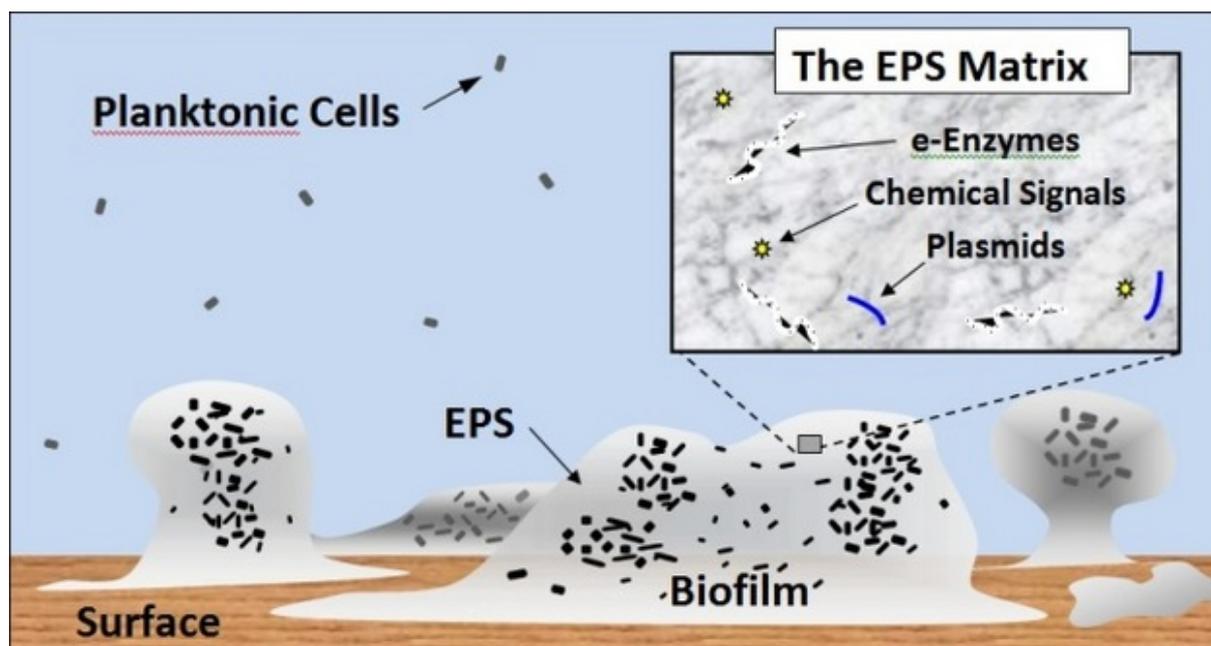
En conditions naturelles, les bactéries se développent sous deux formes (**Clutterbuck et al., 2007**), une forme libre ou planctonique, et une forme sessile ou attachée en biofilm. Les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes. Un mode de vie planctonique permet aux microorganismes de proliférer et de coloniser de nouvelles niches environnementales. Puis, en s'attachant à une surface de façon irréversible, les micro-organismes peuvent alors adopter une forme de vie sessile, qui est le mode de vie majoritaire des bactéries (**Costerton et al., 1999**). Une fois attachées entre elles et/ou à une interface, les bactéries se développent et produisent des polymères extracellulaires, formant une matrice à forte teneur en eau, protéines, polysaccharides et lipides (**Sutherland, 2001**).

### 1.2. Définition

Les biofilms sont des micro-organismes immobilisés sur un substrat et typiquement enchâssés dans un polymère organique d'origines microbiennes. Ils se développent sur virtuellement toutes les surfaces dans les environnements naturels aqueux qu'elles soient biologique (plantes et animaux aquatiques) ou non (béton, métal, plastique et pierres). Les biofilms se forment particulièrement rapidement dans des systèmes où l'eau circule et où les micro-organismes reçoivent un apport régulier de nutriment. Un intense développement accompagné de l'excrétion de grandes quantités de polymères extracellulaires, conduit à la formation de couches visqueuses visibles sur les surfaces solides.

L'unité structurale du biofilm est donc la micro-colonie (**Costerton, 1999**). La composante bactérienne représente 10 à 25% du biofilm, les 75 à 90% autres étant principalement composés par la matrice. Les bactéries de la micro-colonie sont caractérisées par l'absence de mouvements browniens.

On peut donc définir simplement le biofilm comme des agrégats de microcolonies bactériennes fixées à un support et engluées dans leurs propres exopolymères formant une matrice (**Figure 2**); les bactéries ne représentant que 10 à 25% en masse du biofilm. La matrice d'exopolysaccharide, représente quelque 85 % du volume total.



**Figure 2** : Schéma représente les composants d'un biofilm (tel que : surface, cellules bactériens, EPS « exopolysaccharides ») (Cerning., 1990).

### 1.3. Les principaux constituants du biofilm

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. La présence de canaux permet l'établissement de flux d'eau, d'ions et de nutriments (Clutterbuck *et al.*, 2007). Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm. La matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique carbonée d'un biofilm. Suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice (Sutherland 2001, Branda *et al.*, 2005).

Les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolymères sont variables d'un biofilm à l'autre. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet à certains biofilm de lutter contre la dessiccation dans le milieu naturel. La matrice d'exopolymères joue aussi un rôle majeur dans les propriétés de résistance aux biocides des biofilm, en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (Donlan et Costerton 2002).

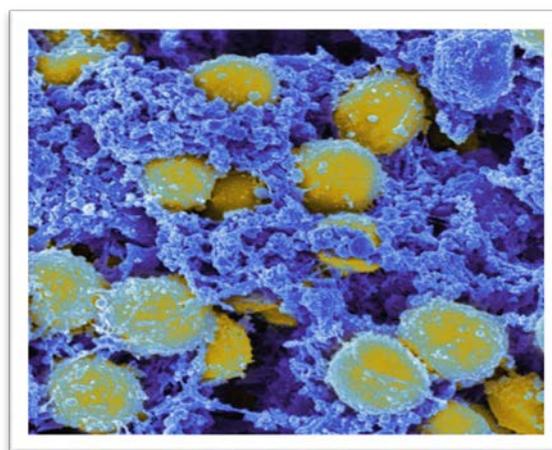
Ainsi, la matrice Exopolymérique joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de barrière protectrice contre la dessiccation, les biocides mais aussi contre les bactériophages (Donlan et Costerton, 2002).

#### 1.4. Formation des biofilm

La formation des biofilms est largement décrite dans la littérature (Pratt et Kolter 1998, Filloux et Vallet 2002, Lejeune 2003, Hall-Stoodley *et al.*, 2004, Kolter et Greenberg 2006). La généralisation des étapes de formations des biofilms reposent principalement sur les études menées sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Figure 3), ainsi six étapes peuvent être suivies lors du développement d'un biofilm (Figure 4 sont dessous) qui présente les étapes de formation d'un biofilm tel que : \* Attachement initial réversible ; \* Attachement irréversible ; \* Apparition « ou bien maturation I » du biofilm ; \* Maturation II du biofilm ; \* Erosion et dispersion par détachement autogène ; \* Dispersion.



*Bacillus cereus*



*Staphylococcus aureus*

**Figure 3 :** Observation microscopique d'un biofilm de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* au microscope électronique à balayage.

##### 1.4.1. Conditionnement de surface

La formation d'un biofilm suit plusieurs phases, la première étape est l'établissement d'un film primaire conditionnant la surface et facilitant l'attachement des bactéries. C'est un phénomène rapide n'excédant pas quelques heures.

Durant cette première phase, les molécules organiques et inorganiques présentes dans le milieu se déposent sur la surface. Cette accumulation de molécules à l'interface liquide/solide définit le film de conditionnement et apporte une plus grande concentration en nutriments sur la surface par rapport au milieu liquide. L'adsorption de ces molécules joue un rôle important dans l'attachement des bactéries à une surface par l'altération des propriétés physico-

chimiques de la surface (énergie libre de surface, hydrophobicité, charges électrostatiques, etc...).

#### 1.4.2. Transport et déplacement

La deuxième étape permettant l'établissement d'un biofilm est le transport, ou le déplacement, des micro-organismes vers une interface. Cette étape dépend fortement de la composition du milieu (viscosité, force ionique) et des mouvements des bactéries. Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en condition statique ou en écoulement laminaire) les micro-organismes peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (**Characklis et Cooksey 1983, Marshall 1986, Characklis et al., 1990**) :

- Passif, par un mouvement brownien (**Brown, 1866**) menant à une sédimentation due à la force de gravité s'exerçant sur tous les corps (**Dickson et Daniels 1991, Banks et Bryers 1992**), ou par des mouvements de convection du milieu amenant physiquement les bactéries vers une surface.
- Actif, par le déplacement des bactéries grâce à des appareils locomoteurs (pili, flagelles) vers des substances nutritives (Chimiotactisme)(**Davies, 2000**).

#### 1.4.3. Adhésion réversible

La troisième étape de la formation d'un biofilm est l'adsorption réversible et non-spécifique des bactéries à une surface. L'attachement primaire à une surface est sous l'influence de nombreux facteurs: pH, osmolarité du milieu, température, ... (**Beloin et al., 2008**) et fait intervenir principalement des processus physiques de type van der Waals, électrostatique, interactions hydrophobes (**Van Lossdrecht et al., 1987 ; Bellon-Fontaine et Cerf 1991 ; Faille et al., 2002**) et acide-base de Lewis, dépendant de la nature du support et de son conditionnement. Elle combine les effets d'attraction de forces de van der Waals et les effets de répulsion générés par la double couche d'ions chargés formée en surface. La théorie DVLO (**Dejarguin et Landau 1941, Verwey et Overbeek 1948**) prend en compte la variation d'énergie entre l'énergie d'attraction due aux interactions dipolaires intermoléculaires et l'énergie de répulsion en fonction de la distance entre deux particules. La somme des deux énergies donne l'énergie totale d'interaction.

#### 1.4.4. Adhésion irréversible

L'adhésion irréversible, quant à elle, correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface. Les structures d'adhésion varient selon les types de micro-organismes concernés. Pour les bactéries à Gram-négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries à Gram-positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivant en partie fixées, comme *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*, peuvent utiliser des structures spécifiques comme un pédoncule ou une gaine (Van Houdt et Michiels, 2005). Ces molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts cellule-surface et des contacts cellule-cellule (Lemon *et al.*, 2008).

#### 1.4.5. Maturation

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation. La synthèse des substances exopolymériques (EPS), qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature (Ghigo 2001, Kuchma *et al.*, 2005).

La matrice extracellulaire est constituée de différentes molécules telles que des exopolysaccharides (40-95%), des protéines (1 -60%), des acides nucléiques (1 -10%) et des lipides (1 -40%) (Wingender *et al.*, 2001). La composition et la quantité d'EPS produites par les bactéries varient en fonction du genre bactérien, de l'âge du biofilm et des facteurs environnementaux (Donlan et Costerton, 2002). De plus, d'autres micro-organismes tels que des micro-algues (diatomées) peuvent sécréter des exopolymères dont profitent les bactéries. De nombreuses molécules d'eau sont associées aux exopolymères rendant la matrice hautement hydratée, visqueuse et élastique, on peut alors parler d'hydrogel. Seuls à 1% de matières organiques sont nécessaires pour lier 98 à 99% d'eau et former un gel stable (Donlan et Costerton, 2002).

La maturation du biofilm est divisée en deux phases (Clutterbuck *et al.*, 2007). La première phase est marquée par des régulations de gènes engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Par exemple, au cours de la formation d'un biofilm d'*Escherichia coli*, 22% des gènes sont stimulés et l'expression de 16% des gènes est inhibée (Prigent-Combaret et Lejeune 1999, Prigent-Combaret *et al.*, 1999). Lors de la formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* par exemple, des gènes codant pour

des enzymes intervenant dans la fermentation et la glycolyse (phosphoglycérate mutase, triose phosphate isomérase et alcool déshydrogénase) sont stimulés. Les régulations concernent essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies, suggérant la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support (Sauer *et al.*, 2002, Becker *et al.*, 2001). La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses polymériques importantes. L'épaisseur maximale du biofilm est alors atteinte durant la phase de maturation (Clutterbuck *et al.*, 2007).

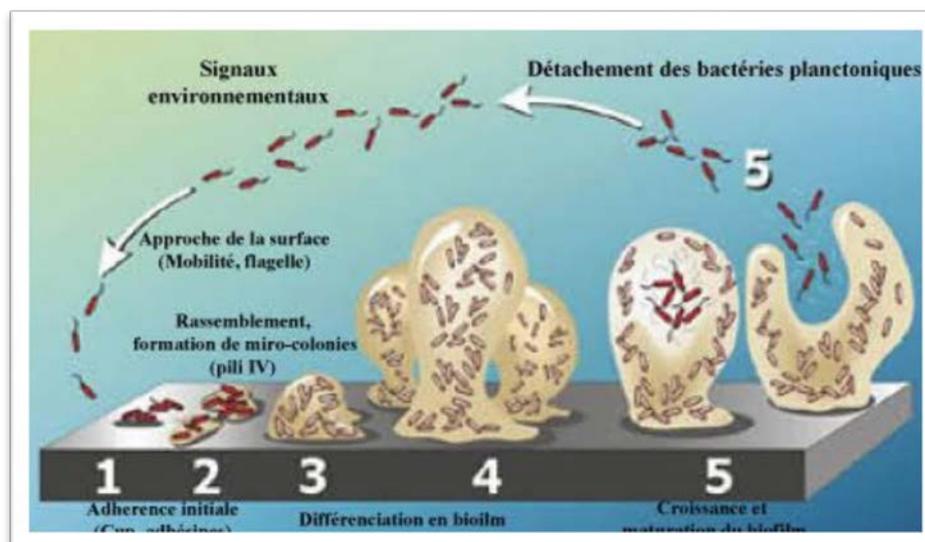
#### 1.4.6. Dispersion

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le biofilm subit des phénomènes de dispersion. Lors de cette phase, des formes planctoniques sont rélargies dans le milieu extérieur. Cette libération permet de promouvoir une diversité génétique et de favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques engendrant la formation d'autres biofilms (Parsek et Greenberg 2005, Clutterbuck *et al.*, 2007).

Les mécanismes d'attachement et de détachement d'un biofilm sont étroitement liés puisque les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement (Spormann, 2008). Plusieurs facteurs peuvent induire le détachement du biofilm et l'essaimage de bactéries sous forme planctonique, permettant ainsi la colonisation d'autres sites. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- L'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple,
- La lyse des cellules du biofilm par l'induction d'un prophage, de l'EDTA, du NaCl, du CaCl<sub>2</sub>, ou encore par l'action d'agents chélateurs (Spormann, 2008),
- L'action de facteurs de détachements : agents tensioactifs ou enzymes dégradant la matrice (Otto, 2008).

La dispersion d'un biofilm peut aussi être initiée par des changements environnementaux : limitation en oxygène ou en nutriments (Spormann, 2008), modification du pH ou présence de certains composés spécifiques (Gjermansen *et al.*, 2005) ou par l'action mécanique exercée par un flux de liquide. Les conditions environnementales, notamment la privation en oxygène, jouent un rôle très important dans le déclenchement de la dispersion des biofilms (Thormann *et al.*, 2006).



**Figure 4** : Représentation schématisée des principales étapes de la formation d'un biofilm à partir de cellule planctonique (mobile) (Stoodley *et al.*, 2002).

### 1.5. Le Quorum Sensing

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « quorum sensing », jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilm.

#### 1.5.1. Définition

Le quorum sensing est un système de communication, basé sur la synthèse, l'émission et la réception par les cellules de facteurs moléculaires diffusibles « l'auto inducteurs » (Parsek, 2005). Suivant la concentration d'auto-inducteur dans le milieu, les bactéries déclenchent des mécanismes synchronisés au sein du biofilm comme l'expression de facteurs de virulence, le développement du biofilm (détachement ou attachement de nouvelles bactéries) (Tomlin, 2005). Ces petites molécules s'accumulent jusqu'à une concentration seuil (quorum) qui une fois atteinte engendre une cascade de signalisations aboutissant à une réponse adaptée et coordonnée de toutes les cellules d'une même espèce (Bassler, 2002 ; Camara *et al.*, 2002 ; Fuqua et Greenberg, 2002 ; Waters et Bassler, 2005).

Chez les bactéries à Gram positif, les auto-inducteurs sont des oligopeptides (Gray, 1997 ; Keller et Surette, 2006 ; Irie et Parsek, 2008), ces molécules sont très spécifiques et peuvent parfois permettre de distinguer le signal entre deux souches d'une même espèce. Cette forte spécificité a été particulièrement marquée chez *Staphylococcus aureus* dont les souches sont classées en fonction de leur signal oligopeptidique (Ji *et al.*, 1997 ; Lyon *et al.*,

2002 ). Chez *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et chez d'autres espèces de Staphylocoques, l'expression coordonnée des facteurs de virulence, en fonction des signaux extracellulaires, est contrôlée en grande partie par un régulateur global nommé agr (accessory gene regulator) (Wolz *et al.*, 2000 ; Kong *et al.*, 2006; Novick, 2006; Yarwood, 2006).

### 1.6. Biofilm dans le domaine agroalimentaire

La présence de biofilm a un impact considérable dans l'industrie agroalimentaire touchant tous les secteurs : laiteries, industries de transformation de la viande, brasseries, sucreries,.....etc. tout équipement non stérilisé abrite des microorganismes qui peuvent démarrer un processus de colonisation notamment dans des zones peu accessibles au nettoyage et à la désinfection (Tomlin, 2005). Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures, et permettre ainsi aux bactéries qui s'y trouvent de devenir résistantes aux agents extérieurs engendrant d'éventuelles contaminations (biofilms composés de bactéries pathogènes comme *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus*) (Thormann *et al.*, 2006).

## 1. Historique

La découverte de l'acide salicylique date de 1828 quand Johann Buchner a isolé, à partir de l'écorce de saule, le glucoside d'alcool salicylique. Le nom de l'acide salicylique (SA) a été donné par Raffaele Piria en 1838. Et c'est en 1874 en Allemagne que la première production commerciale du SA synthétique a débuté, son dérivé l'acide acétylsalicylique a été introduit sous le nom commerciale d'aspirine en 1898.

Depuis la découverte en 1990 de la production de l'acide salicylique lors de l'établissement de la résistance systémique chez le concombre et le tabac, beaucoup d'efforts ont été déployés pour élucider le rôle de cette molécule dans cette résistance (**Metraux et al.,1990 ; Malamy et al.,1990 ;Raskin, 1992 ; Delaney et al.,1994**). Chez le tabac, il a été montré que les mêmes gènes activés dans la réaction de défense contre le virus de la mosaïque de tabac (TMV) sont exprimés par application du SA (**Ward et al.,1991**). Par la suite, l'acide salicylique a été reconnu comme molécule de signalisation dans la défense des plantes contre divers agents pathogènes (**Ened et al.,1992 ;Gaffney et al.,1993**).

## 2. Définition de l'acide salicylique

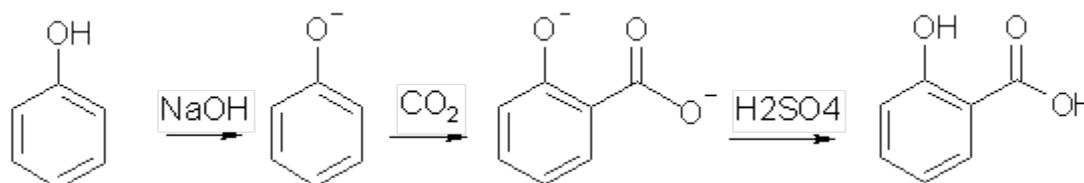
L'acide salicylique (SA), un composé phénolique issu de la voie de biosynthèse des shikimat-phénylpropanoïdes, joue un rôle clé dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes. En effet, ce composé est impliqué à la fois dans la mise en place d'une résistance locale, dans la régulation de l'expression des gènes de défense et la réaction d'hypersensibilité, et dans la mise en place d'une résistance générale, de longue durée et à large spectre, qui protège la plante contre des infections ultérieures et appelée SAR (de l'anglais « Systemic Acquired Résistance ») (**Durant et Dong , 2004 ; Loake et Grant, 2007**).

Cet acide (SA) est synthétisé dans les plantes en réponse à l'attaque de divers pathogènes et constitue un élément clef pour l'établissement de la résistance locale et la SAR (**Loake et Grant, 2007**). Il est impliqué dans plusieurs réponses aux stress biotique (infection par les pathogènes) et abiotique (excès de radiation UV, des niveaux d'ozone accrus) et qui interagissent avec les espèces réactives d'oxygène dans un réseau de signalisation encore pas bien élucidé. Le SA module aussi la mort cellulaire associée à la réponse hypersensible, l'activation de la peroxydation des lipides et la génération de radicaux libres (**Dempsey et al.,1999 ;Shah et Klessig, 1999**).

### 3. Propriétés physico-chimique

Le groupement acide carboxylique (-COOH) peut réagir avec un alcool en donnant de nombreux esters. Le groupe hydroxyle peut réagir avec l'acide acétique pour former de l'acide acétylsalicylique, ou aspirine (**Chen et al.,1991**).

Industriellement, l'acide salicylique est synthétisé par la réaction de Kolbe :



**Figure 5** : La synthèse de l'acide salicylique par la réaction de Kolbe (**Chen et al.,1991**).

### 4. Structure et biosynthèse de l'acide salicylique

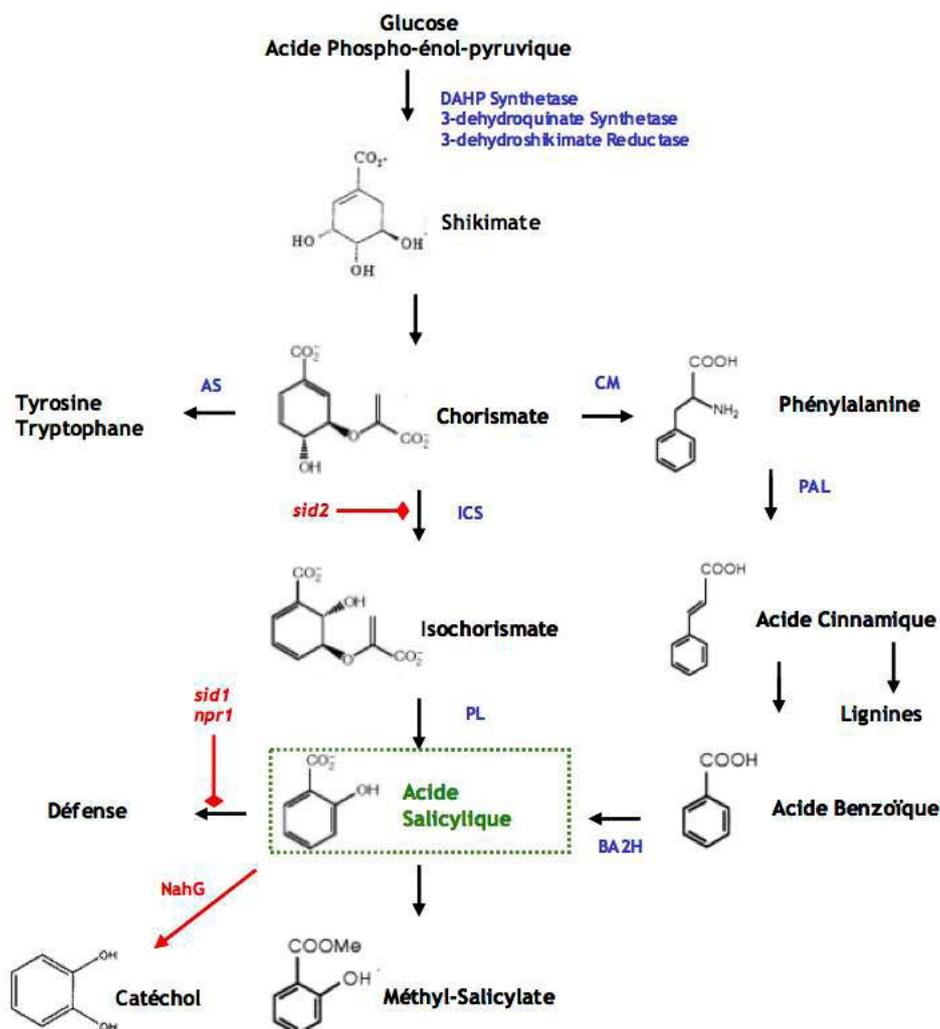
Chimiquement, le SA appartient à un groupe de composés phénoliques qui possèdent un anneau aromatique et un groupe hydroxyle. C'est une petite molécule de 138,12g de poids moléculaires, peu soluble dans l'eau, mais soluble dans des solvants organiques.

Deux voies de biosynthèse du SA ont été décrites (**figures 6**) :

- La voie des shikimat –phénylpropanoïdes (**Hermann et Weaver, 1999**). Elle commence par la version du phénylalanine en acide trans-cinnamique par la PAL(phenylalanineammonialyase).l'acide trans-cinnamique donne le SA après une chaîne de réaction produisant l'acide benzoïque qui en subissant une hydroxylation au niveau du carbone 2 donne l'acide salicylique (**Yalpani et al.,1993**). Cette dernière étape est catalysée *al* par le cytochrome P450 monooxygène appelée aussi l'acide benzoïque hydroxylase (BA2H) dont l'activité est induite par l'application de l'acide benzoïque ou par les agents pathogènes(**Leon et al.,1995**).

L'étape limitant la production du SA est celle entre l'acide trans-cinnamique et l'acide benzoïque (Yalpani *et al.*, 1993). Le mécanisme de production de l'acide benzoïque à partir de l'acide trans-cinnamique est inconnu. Il pourrait s'agir d'une hydroxylation rappelant la  $\beta$  oxydation des acides gras. Cette suggestion est soutenue par des études faites chez le *Quercus pedunculata* chez qui il a été montré que la transformation de l'acide trans-cinnamique est stimulée par l'acétyl-coA (Alibet et Ranjeva, 1971).

- Cependant, il a été montré que quelques plantes sont capables de synthétiser le SA à partir du chorismate. Cette voie de synthèse implique deux enzymes, l'isochorismatesynthase (ICS) et l'isochorismate pyruvate lyase (IPL) (Vasyukova et Ozertskovskaya, 2007).



**Figure 6 :** Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique (Lee *et al.*, 1995 ; Wildermuth *et al.*, 2001).

Les enzymes responsables des transformations sont indiqués en bleu.les plantes NahGexpriment la salicylate hydroxylase qui dégrade le SA en catéchol.ICS, Isochorismatesynthase ;PAL, phénylalanineamonia-lyase ; BA2H, l'acide benzoïque 2 hydroylase ;IPL,Isochorismate pyruvate lyase.

La première enzyme catalyse la conversion du chorismate en isochorismate, et la deuxième la conversion de ce dernier en SA. L'expression des gènes bactériens ICS et IPL dans des plantes de tabac et d'Arabidopsis a engendré une accumulation de SA et une amélioration de la résistance contre les agents pathogènes (Mauch *et al.*,2001).

Les études de Wilderuth et autre ont montré que le mutant d'Arabidopsis sid2 (eds16) (salicylic acid induction deficient2 ;enhanced disease susceptibility16) affecté dans le gène ICS ,accumule très peu de SA et présente une sensibilité accrue aux maladie(Wildermuth *et al.*,2001).

## 5. Le mode d'action de l'acide salicylique

Différents niveaux d'interventions du AS ont été décrites (Vasyukova et Ozeretskoykaya, 2007)

- Le SA active l'expression des gènes intervenant dans la défense des plantes (Vasyukova *et al.*, 1999).Plusieurs PR protéines « pathogenes related proteines »induites par le SA one des activités antimicrobiennes, c'est le cas des chitinases et de  $\beta$ 1-3 glucanase (Mauch *et al.*,1988 ;Salzman *et al.*,1998). D'autres appartiennent à la famille des PR-1, elles ont activités inhibitrice de la croissance mycélienne (Niderman *et al.*, 1995 ;Rauscher *et al.*, 1999).
- Le SA a aussi la capacité de lier des enzymes comme les catalases, les ascorbates peroxydases et les aconitases(Farmer *et al.*,1998 ;Zhang *et al.*,1998 ;Coa et Dang,1998 ;Mikolajczyk *et al.*,2000). La capacité du AS d'inhiber la catalase(enzyme qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène) pourrait prolonger le demi vie du  $H_2O_2$ et conduirait à l'amplification du stress oxydatif à l'origine du déclenchement des réactions de la défense locale (Chen et Klessing, 1991 ;Mehdy, 1994 ;Ruffer *et al.*,1995 ;Levine *et al.* ,1996 ;Panina *et al.* ,2004)
- Le SA interviendrait aussi comme molécule de signalisation susceptible de migrer dans les vaisseaux de la plantes, et conférer une immunité à distance aux tissus de la plante dans la SAR (Raksin, 1992 ; Chen *et al.*,1993).Cependant, il a été rapporté

que le SA ne serait pas le signal mobile de la SAR mais qu'il est nécessaire pour son établissement (Vernooij *et al.*,1994).D'autres molécules notamment l'acide jasmonique et l'éthylène inter viendraient dans la signalisation aboutissant aux réactions de défense. Ces molécules agiraient indépendamment ou en synergie avec la voie de le AS.

## 6. Résistance Systémique Induite

L'acide salicylique n'est pas nécessaire à l'expression de la résistance systémique acquise dans certains cas précis .Par exemple, des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. colonisés par une bactérie non pathogénique, *Pseudomonas fluorescens*, devient très résistantes à l'attaque de plusieurs parasites (Pieterse *et al.*,2001).Cette résistance contrôlée par la bactérie *P.fluorescens* est appelée ISR (Induced Systemic Resistance) (Dong,1998). L'ISR est dépendante de l'action du gène NPR1mais n'est pas associée à l'accumulation du SA ni à l'activation de protéines PR (Pieterse, 2001).

En revanche, cette résistance contrôlée semble être dépendante de l'acide jasmonique et éthylène (Beckers et Spoel, 2006).

## 7. Effet de l'Acide Salicylique sur la formation de biofilm par *S.aureus* et *B.cereus*

Plusieurs études ont également indiqué l'effet de l'acide salicylique (AS) sur la formation de biofilm par *S. aureus* et *B.cereus* (Mei *et al.*, 2010).

La signalisation QS chez les *S.aureus* et *B.cereus* contrôle beaucoup de facteurs de virulence et donc pourrait réguler la formation de son biofilm. Une étude réalisée sur le biofilm de *S.aureus* et *B.cereus* révèle que le blocage de la signalisation QS permettrait de détruire la formation de biofilm et de diminuer la résistance aux antibiotiques (Adonizio *et al.*, 2008).

D'autres études ont également indiqué que l'acide salicylique (AS) perturbe chacun des trois systèmes de QS (las, rhl et pqs) de *S.aureus* et *B.cereus* (Yang *et al.*, 2009). En outre, il a été observé que l'AS change la structure et la composition d'un mutant lasR de *S.aureus* (abrupt par une insertion de Tn à lasR) (Yang *et al.*, 2009).

## IV. Matériel et méthodes

### Objectif du travail :

Dans cette étude, la détection de la formation de biofilm de *S.aureus* et *B.cereus* est basée sur trois techniques, couramment décrites dans ce contexte à savoir ; la cinétique de la formation de biofilm (DO), la coloration de biofilm formés au cristal violet (CV) et l'effet d'acide salicylique (AS) sur la formation de biofilm. Les différentes expériences ont été menées sur cinq souches de *S.aureus* et cinq souches de *B.cereus*.

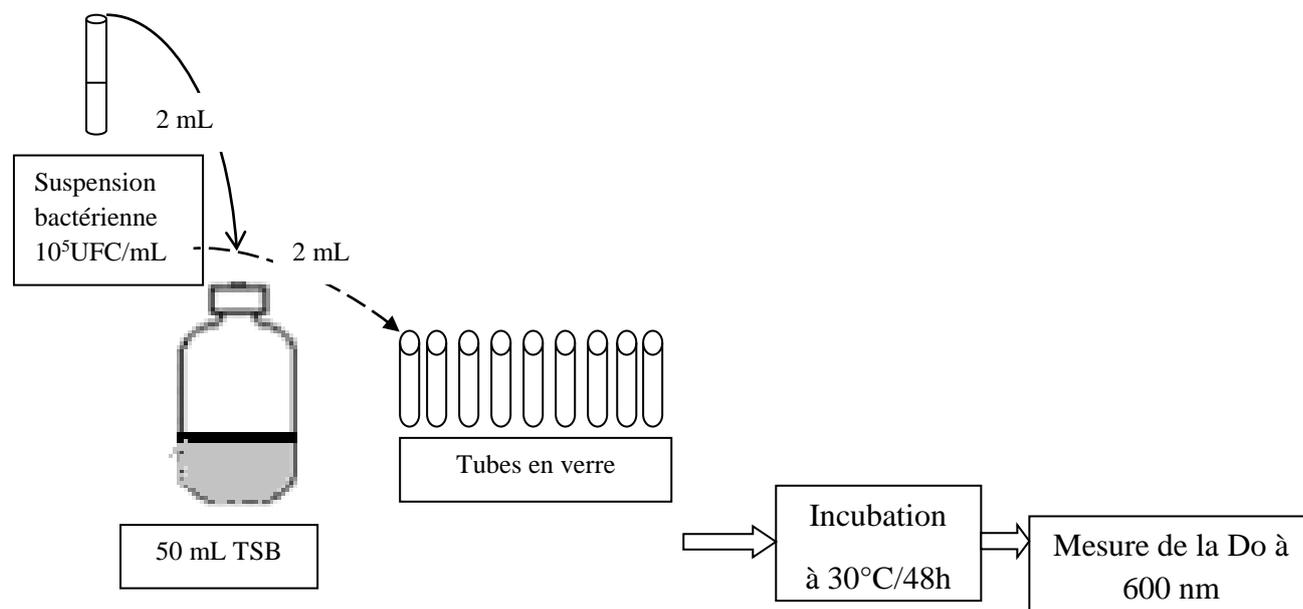
### 1. Obtention des souches bactériennes

Les différentes souches de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus* testées dans cette étude, ont été isolées à partir des denrées alimentaires. L'identification a été faite par des tests biochimiques et des API systèmes.

### 2. Cinétique de croissance des souches bactériennes au cours de formation du biofilm bactérien

A raison d'évaluer la croissance planctonique et la biomasse adhérente des 10 isolats bactériens, nous avons inoculé un flacon contenant 50 ml du milieu TSB par 2 ml de suspensions bactériennes de chacune des dix isolats de *B.cereus* et *S.aureus* contenant dans de l'eau physiologie stérile ajustée à 600 nm à une densité optique de 0,05 (ce qui correspond approximativement à une concentration de  $10^5$  UFC/ml). Ce volume a été réparti à raison de 2ml dans chaque tube en verre et nous avons fait l'incubation à 30°C pendant 48h. Les essais ont été faits en trois répétitions.

Après différents temps d'incubation (2h, 4h, 6h, 20h, 24h, 30h et 48h) à 30°C nous avons mesuré la densité optique à 600nm des suspensions bactériennes.



**Figure 7:** Evaluation de la cinétique de croissance des isolats bactériens de *B. cereus* et *S. aureus* au cours de formation de biofilm.

### 3. Formation des biofilm bactériens

#### 3.1. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction du temps d'incubation

Après 2h, 4h, 6h, 20h, 24h, 30h et 48h d'incubation des tubes contenant le milieu TSB inoculé, l'évaluation de la biomasse adhérente a été réalisée par mesure spectrophotométrique à  $595\text{ nm}$ , après l'utilisation d'analyse de violet cristal (Yang et al., 2009).

##### ▪ Analyse cristal violet

La quantification de la biomasse adhérente est faite selon la méthode du cristal violet. La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration au CV à 1 % (1g de la poudre de cristal violet dans 100 ml d'eau distillée). Un temps de contact de 30 mn est estimé pour la coloration. Ensuite l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'eau distillée. Les tubes sont ensuite égouttés et sécher à l'air libre (Yang et al., 2009).

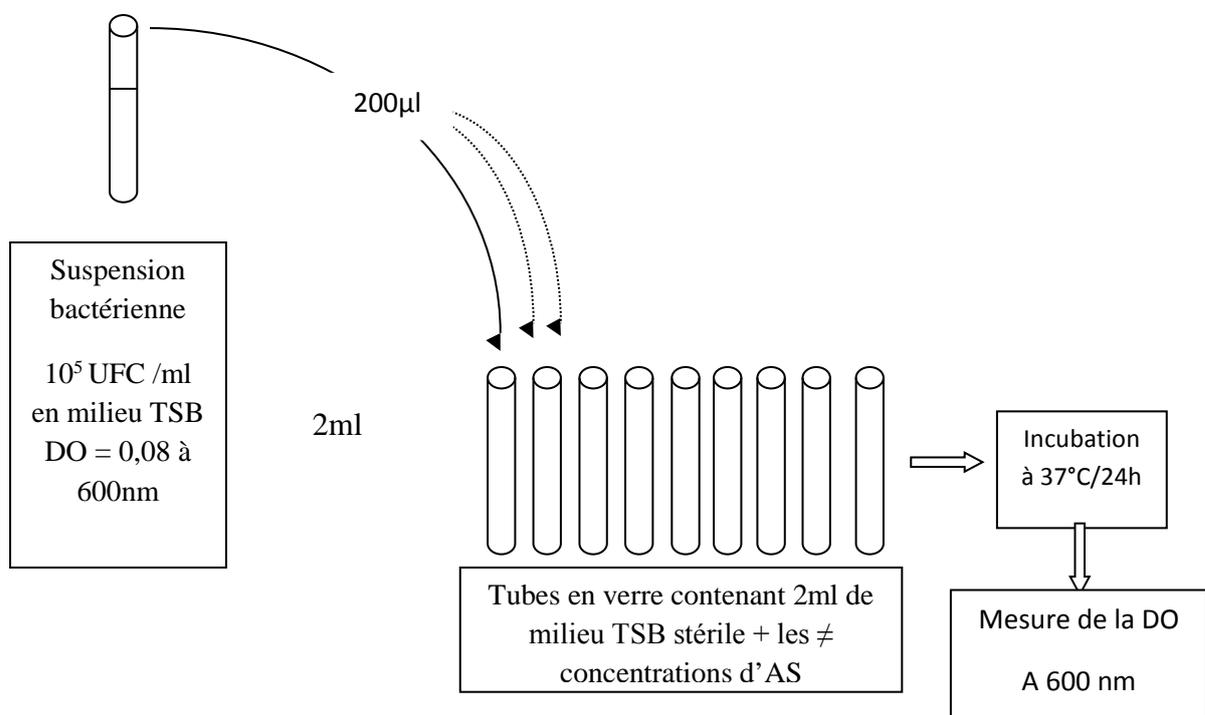
La biomasse fixée est récupérée avec la solubilisation du cristal violet fixé sur les parois du tube à l'aide d'une solution d'un mélange éthanol  $95^\circ\text{C}$  (2 ml). L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à  $595\text{ nm}$  à l'aide d'un spectrophotomètre. La biomasse

bactérienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

#### 4. Détermination de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique des souches bactériennes étudiées

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration d'antibactérienne capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Ici sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés.

Chacune des dix isolats de *B.cereus* et *S.aureus* étudiées est inoculée dans des tubes à raison de 2 ml de suspension bactérienne ajustée à une densité optique (DO) de 0,04 contenant 2ml de milieu TSB ajusté avec les différentes concentrations de l'AS (0,03-0,06- 0,138 - 0,34-0,69 – 1,38 – 2,76 mM ) testées. Ces tubes sont incubés à 30°C pendant 24h.

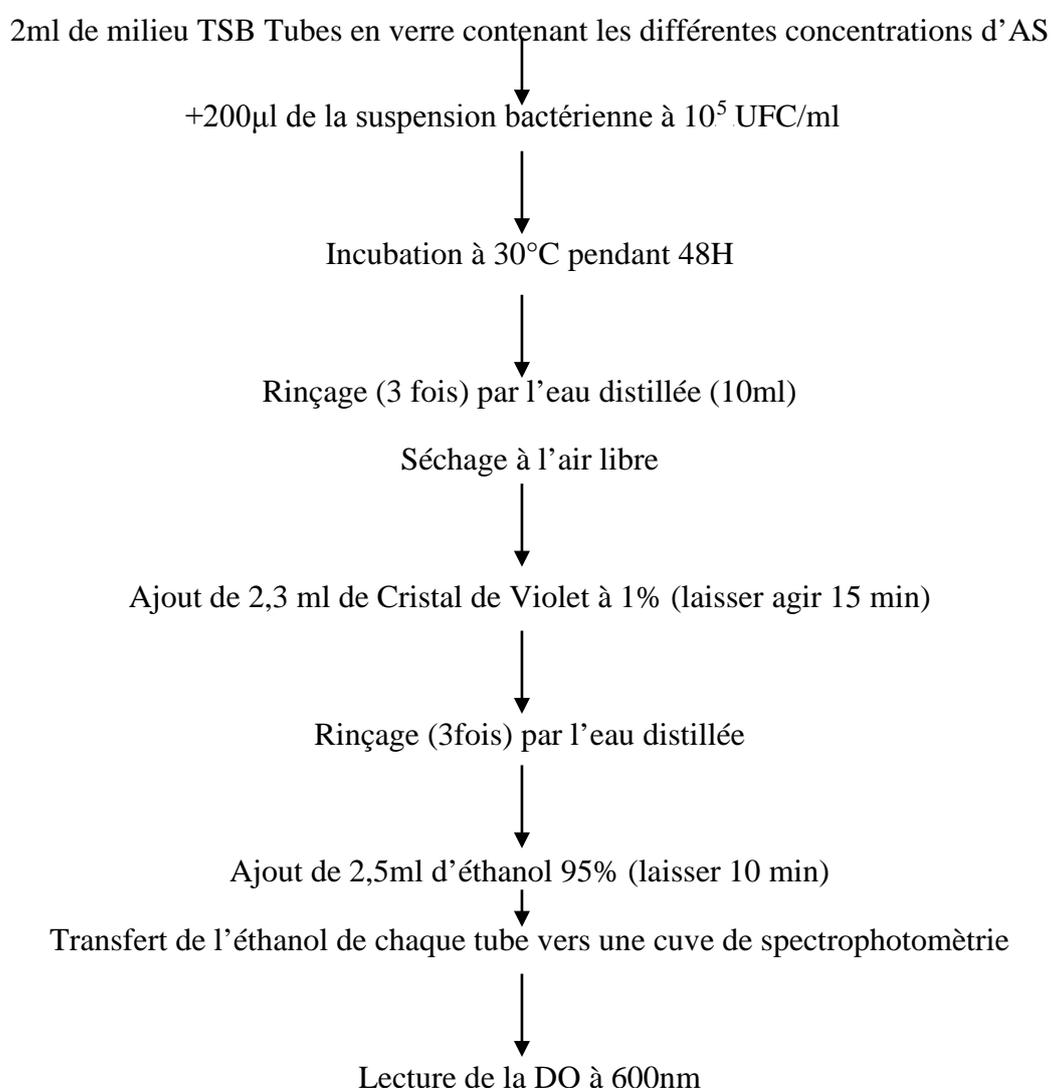


**Figure 8 :** Diagramme représentant l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique et l'adhérence de *B. cereus* et *S. aureus*.

### 5. L'étude de l'effet d'acide salicylique sur la formation de biofilm de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*

Dans le but d'étudier l'effet acide salicylique sur la formation de biofilm par *B.cereus* et *S.aureus*, nous avons utilisé la méthode d'analyse cristal violet décrit par **Djordjevic en 2002**.

Chacune des dix isolats et la souche *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* étudiés est inoculée dans des tubes à raison de  $10^5$  UFC/ml soit 200  $\mu$ l de suspension bactérienne/tube, ces tubes contenant préalablement 2ml de milieu Bouillon de TSB additionné par les différentes concentrations de l'AS. Ces tubes sont incubés semi-quantitativement 48h. La quantification des biofilms attachés aux tubes est évaluée semi-quantitativement par l'analyse cristal violet après d'incubation de 24 H.



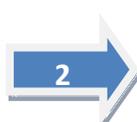
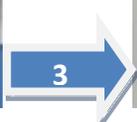
**Figure 9** : Protocole de quantification de la formation de biofilm (**Djordjevic, 2002**).

**Annexe 3: Résultats de la formation de biofilm****Annexe 3.1. Evolution de la production de biofilm par la méthode CV**

(1) Incubation/ Croissance, (2) Lavage 3 fois et coloration au Cv, (3) Lavage jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes/ égouttés et mise à sécher à l'aire libre, (4) Solubilisation du CV fixé par l'Ethanol 95% pendant une heure, (5) Quantification au spectrophotomètre



Bouillon TSB

Culture  
Bactérienne après  
incubationColoration par  
Cristal VioletFixation de  
cristal violet sur  
les parois du tubeLe cristal violet  
soluble dans alcool  
(Ethanol)

## ANNEXES

## Annexe 1 : Les milieux de culture

- Gélose nutritive (GN)

Peptone :.....	6g
Extrait de viande :.....	1g
Extrait de levure :.....	2g
Na CL :.....	5g
Agar :.....	20g
Eau distillée :.....	1000mL
pH :.....	7.2

- Bouillon nutritive (BN)

Peptone :.....	6g
Extrait de viande :.....	1g
Extrait de levure :.....	2g
Na CL :.....	5g
Eau distillée :.....	1000mL
pH:.....	7.2

- Milieu TSB (TrypticSoyBroth)

## Digestion pancréatique de

caséine :.....	17 g/L
Digestion enzymatique de farine de soja : .....	3 g/L
Na CL :.....	5 g/L
$K_2HPO_4$ :.....	2.5g/L
Dextrose :.....	2.5g/L
Eau distillé :.....	1000mL
pH :.....	7.2

## Annexe n°2 :

**1. Cinétique de croissance bactérienne de *B. cereus* et *S. aureus* au cours de formation du biofilm bactérien :**

**a-Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de *Bacillus cereus* au cours de formation de biofilm :**

SOUCHE TEMPS	BFM617	BLP2	PBTS1	BRIS3	BCSV1
T0	0,11±0.01	0,11±0.01	0,11±0.01	0,11±0.01	0,11±0.01
T1	0,691±0.001	0,581±0.001	0,541±0.001	0,671±0.001	0,534±0.001
T2	0,837±0.001	0,608±0.001	0,955±0.001	0,866±0.001	0,616±0.001
T3	0,972±0.001	0,726±0.001	1,111±0.001	0,903±0.001	0,742±0.001
T4	1,116±0.001	0,886±0.001	1,158±0.001	0,923±0.001	0,826±0.001
T5	1,273±0.002	1,135±0.001	1,231±0.001	0,993±0.001	1,043±0.001
T6	1,32±0.001	1,222±0.001	1,361±0.001	1,116±0.001	1,231±0.001
T7	1,431±0.001	1,32±0.001	1,601±0.001	1,516±0.403	1,262±0.001

SOUCHE TEMPS	BFM617	BLP2	PBTS1	BRIS3	BCSV1
T0	6,66±0.01	6,61±0.01	6,81±0.01	6,57±0.01	6,65±0.01
T1	6,11±0.01	6,41±0.01	6,61±0.01	6,33±0.01	6,44±0.01
T2	5,93±0.01	6,34±0.01	6,39±0.01	6,09±0.01	6,29±0.01
T3	5,65±0.01	6,01±0.01	6,21±0.01	5,86±0.01	5,97±0.01
T4	5,31±0.01	5,88±0.01	5,66±0.01	5,73±0.01	5,76±0.01
T5	5,01±0.01	5,21±0.01	5,5±0.01	5,67±0.01	5,53±0.01
T6	4,96±0.01	5,12±0.01	5,23±0.01	5,14±0.01	5,17±0.01
T7	4,64±0.01	4,99±0.01	4,86±0.01	5,03±0.01	5,04±0.01

**b- Evaluation de la cinétique de croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* au cours de formation de biofilm :**

SOUCHE TEMPS	SVLY3	SPRE2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4
T0	0,11±0.05	0,11±0.04	0,11±0.04	0,11±0.04	0,11±0.04
T1	0,868±0.04	0,456±0.05	0,593±0.04	0,417±0.05	0,403±0.05
T2	0,954±0.03	0,692±0.06	0,713±0.06	0,559±0.06	0,561±0.04
T3	1,022±0.04	0,754±0.04	0,856±0.05	0,682±0.04	0,762±0.04
T4	1,148±0.04	0,889±0.04	0,986±0.04	0,782±0.05	0,802±0.05
T5	1,297±0.03	0,981±0.06	1,301±0.04	0,893±0.06	0,923±0.04
T6	1,369±0.04	1,113±0.05	1,438±0.05	0,999±0.05	1,118±0.05
T7	1,377±0.05	1,297±0.04	1,487±0.06	1,152±0.04	1,251±0.04

SOUCHE TEMPS	SVLY3	SPRE2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4
T0	6,93±0.15	6,54±0.15	6,86±0.19	6,47±0.18	6,86±0.19
T1	6,47±0.16	6,23±0.16	6,24±0.16	6,21±0.19	6,51±0.20
T2	6,21±0.17	6,01±0.17	6,21±0.17	6,19±0.15	6,16±0.23
T3	5,96±0.18	5,64±0.18	6,1±0.18	6,01±0.20	5,74±0.22
T4	5,24±0.18	5,31±0.20	6,07±0.22	5,86±0.21	5,55±0.24
T5	5,01±0.20	5,16±0.21	5,94±0.23	5,24±0.22	5,43±0.25
T6	4,86±0.21	5,1±0.18	5,66±0.24	5,09±0.20	4,86±0.21
T7	4,59±0.22	4,59±0.19	5,11±0.23	4,84±0.19	4,53±0.19

## 2. Evaluation de la biomasse adhéree par la méthode Cristal Violet (CV) :

### a-Evaluation de la biomasse adhéree de *Bacillus cereus* au cours de formation de biofilm :

SOUCHE TEMPS	BFM617	BLP2	PBTS1	BRIS3	BCSV1
T0	0,219±0.05	0,774±0.07	0,232±0.06	0,129±0.04	0,146±0.05
T1	0,457±0.05	0,141±0.07	0,426±0.06	0,547±0.04	0,279±0.05
T2	0,565±0.05	0,21±0.07	0,539±0.06	0,652±0.04	0,355±0.05
T3	0,728±0.05	0,302±0.07	0,642±0.06	0,849±0.04	0,423±0.05
T4	0,847±0.05	0,689±0.07	0,842±0.06	0,965±0.04	0,58±0.05
T5	0,96±0.05	0,803±0.07	0,959±0.06	1,073±0.04	0,747±0.05
T6	1,352±0.05	0,954±0.07	0,966±0.06	1,157±0.04	0,941±0.05
T7	1,6±0.05	0,981±0.07	1,098±0.06	1,564±0.04	1,028±0.05

### b-Evaluation de la biomasse adhéree de *Staphylococcus aureus* au cours de formation de biofilm.

SOUCHE TEMPS	SVLY3	SPRE2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4
T0	0,267±0.04	0,165±0.05	0,216±0.06	0,249±0.04	0,206±0.075
T1	0,342±0.04	0,284±0.05	0,416±0.06	0,352±0.04	0,352±0.075
T2	0,448±0.04	0,302±0.05	0,608±0.06	0,527±0.04	0,441±0.075
T3	0,636±0.04	0,421±0.05	0,712±0.06	0,72±0.04	0,597±0.075
T4	0,734±0.04	0,622±0.05	0,959±0.06	0,864±0.04	0,728±0.075
T5	0,867±0.04	0,772±0.05	1,116±0.06	0,994±0.04	0,884±0.075
T6	0,961±0.04	0,822±0.05	1,161±0.06	1,302±0.04	0,957±0.075
T7	1,003±0.04	0,981±0.05	1,308±0.06	1,4±0.04	1,052±0.075

**3-Détermination de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique des souches bactériennes étudiées :**

**a-Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de *Bacillus cereus*.**

SOUCHE TEMPS	BFM617	BLP2	PBTS1	BRIS3	BCSV1
T0	1,412±0.05	1,211±0.05	1,311±0.05	1,232±0.05	1,11±0.05
T1	1,366±0.04	1,074±0.04	1,133±0.04	0,975±0.04	1,007±0.04
T2	1,267±0.05	0,976±0.05	1,011±0.05	0,902±0.05	0,989±0.05
T3	1,133±0.07	0,88±0.07	0,997±0.07	0,883±0.07	0,82±0.07
T4	0,983±0.06	0,758±0.06	0,875±0.06	0,723±0.06	0,749±0.06
T5	0,897±0.04	0,644±0.04	0,755±0.04	0,64±0.04	0,617±0.04
T6	0,778±0.06	0,589±0.06	0,633±0.06	0,559±0.06	0,505±0.06
T7	0,697±0.04	0,407±0.04	0,533±0.04	0,422±0.04	0,497±0.04

**b-Evaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la croissance planctonique de *Staphylococcus aureus*.**

SOUCHE TEMPS	SVLY3	SPRE2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4
T0	1,21±0.04	1,163±0.04	1,131±0.04	1,211±0.04	1,211±0.04
T1	1,084±0.05	1,07±0.05	1,042±0.05	1,011±0.05	1,081±0.05
T2	1,018±0.06	0,916±0.06	1,036±0.06	0,967±0.06	0,964±0.06
T3	0,999±0.07	0,883±0.07	0,998±0.07	0,915±0.07	0,923±0.07
T4	0,961±0.04	0,876±0.04	0,945±0.04	0,819±0.04	0,832±0.04
T5	0,874±0.05	0,77±0.05	0,802±0.05	0,785±0.05	0,727±0.05
T6	0,742±0.06	0,639±0.06	0,748±0.06	0,677±0.06	0,642±0.06
T7	0,64±0.04	0,541±0.04	0,668±0.04	0,589±0.04	0,509±0.04

### 3.2. Etude de l'effet d'acide salicylique sur la formation de biofilm de *Bacillus cereus* et

#### *Staphylococcus aureus* :

##### a- Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de *Bacillus cereus* :

SOUCHE TEMPS	BFM617	BLP2	PBTS1	BRIS3	BCSV1
T0	0	0	0	0	0
T1	3,234946871±2	11,33736929±2	13,57742182±1	20,86038961±2	9,279279279±2
T2	10,24793388±2	19,42762796±1	22,88329519±1.5	26,78571429±1.5	10,9009009±2
T3	19,74025974±2	27,35277931±2.5	23,9511823±2	28,32792208±2	26,12612613±1.5
T4	30,36599764±2	37,42432581±1	33,25705568±2	41,31493506±1	32,52252252±1
T5	36,45808737±2	46,83544304±2	42,41037376±2	48,05194805±2	44,41441441±1.5
T6	44,88783943±2	94,80479126±1.5	51,71624714±1	54,62662338±1	54,5045045±1.5
T7	50,6257379±2	96,41010194±2	59,3440122±2	65,74675325±2	55,22522523±1

##### b- Evaluation de l'effet d'acide salicylique sur les biofilms matures de *Staphylococcus aureus* :

SOUCHE TEMPS	SVLY3	SPRE2R	SFMG5BP	SLGM1	SSEM4
T0	0	0	0	0	0
T1	10,41322314±2	7,970183486±2	7,896287566±1	16,53824986±2	10,75949367±2
T2	15,8677686±2	21,21559633±1	8,426635239±1.5	20,1706109±1.5	20,41827188±2
T3	17,43801653±2	24,05389908±2	11,78550383±2	24,46340121±2	23,80297193±1.5
T4	20,5785124±2	24,6559633±2.5	16,4702416±2	32,38855256±1	31,31535498±1
T5	27,76859504±2	33,77293578±1	29,11019446±2	35,195377±2	39,98348927±1.5
T6	38,67768595±2	45,04013761±2	33,88332351±1	44,1111722±1	47,00055036±2
T7	47,10743802±2	53,4690367±1.5	40,95462581±2	51,37589433±2	57,98018712±1

## Références bibliographiques

### -A-

- **Afssa (2009)**. Avis du 10 avril 2009 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'avis complémentaire concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés.
- **EFSA (2005)**. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. The EFSA Journal, 175, 1- 48.
- **Albert I, Couvert O, De Buyser ML, Catherine D, Faille C, Gohar M, et al. (2009)**. Etude de l'émergence d'une bactérie pathogène dans les filières alimentaires. Le cas de *Bacillus cereus* dans les produits non stériles traités thermiquement. Bull Soc Fr Microbiol.; 24 :506- 13.
- **Alibert G ,Ranjeva R.(1971)** .Recherche sur les enzymes catalysant la formation des acides chez *Quercus pedunculata* (Ehrh).I.Formation des premiers termes des series cinnamique et benzoïque .FEBS Lett ,19 :11-14.
- **Adonizio, A ., Kong, k. and Mathee, K.(2008)**. Inhibiyion of quorum-controlled virulence factor production in *Bacillus Cereus* by South Florida plants extracts.Antimicrob Agents Chemother.52(1) :198-203.

### -B-

- **Bassler BL. (1999)**. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology, 2:6, pp 582-587.
- **Beckers GJM, Spoel SH. (2006)**. Fine-tuning plant defence signalling : salicylate versus jasmonate.Plantbiol.8 :1-10.
- **Beloin C, Houry A, Froment M, Ghigo JM, Henry N. (2008)**. A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. Plos Biology, 6:7, pp 1549-1558.
- **Brown, R. (1866)**. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. In The

miscellaneous botanical works of Robert Brown: Volume 1, Eds. Bennett J, Hardwicke R, London

- **Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology, 13, pp 20-26
- **Brun Y., Bes M. (2000).** *Staphylococcus*. In : Précis de bactériologie clinique (ed. Freyney J RF, Hansen W, Bollet C), ESKA, Paris : 783-830

## -C-

- **Cao H, Li X, Dong X. (1998).** Generation of broad-spectrum disease resistance by over expression of an essential regulatory gene in system acquired resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 95 : 6531-6536.
- **Chen Z, Klessing DF. (1991).** Identification of a soluble salicylic acid binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response. Proc Natl Acad Sci USA, 88 : 8179-8183.
- **Coban A., Ciftci A., Onuk E., Erturan Z., Tanriverdi C.Y., Durupinar B. (2009).** Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with cystic fibrosis. Mikrobiol. Bul, 43 : 563-573.
- **Characklis WG, Cooksey KE. (1983).** Biofilms and microbial fouling. Advances in Applied Microbiology, 29, pp 93-138.
- **Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt D, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. Veterinary Microbiology, 121:1-2, pp 1-17
- **Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. (1999).** How bacteria stick. Scientific American, 238:1, pp 86-95.

## -D-

- **Delarras, C. (2007).** *Staphylococcus*. Dans : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition médicales internationales, Paris : Technique Et Documentation Lavoisier, Vol,1 : p339-340. ISBN-10 : 2743009454, ISBN-13 : 978-2743009458.
- **Davies G. (2000).** Physiological events in biofilm formation. In Community Structure and Co-operation in Biofilms, Eds Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M, Society for General Microbiology Symposia, pp 37-52.

- **Dong X.SA, JA.(1998).**ethylene,and disease resistance in plants.Curr.Opin.Plant Biol.1(4) :316-23.
- **Dempsey,D.M.A., Shah,J.,Klessig,D.F.(1999).**Salicylic acid and disease resistance in plantas. Critical Reviews in Plant Sciences ,18 :547-575.
- **Durant, W. and Dong. (2004).**System icacquired resistance .Annu, Rev. Phytopahtol. 42 :185-209.
- **DelaneyTP,UknesS,VernooijB,FriedrichL,WeymannK,NegrottoD,GaffneyT,Gutrella M ,KessmannH,Ward E,Ryals J.(1994).**Acentral role of salicylic acid in plant disease resistance.Science ,266 :1247-1250.
- **Djordjevic D ., Wiedmann M. And Mclands borough L.A. (2002).** Microtiter Plate Assay for Assessment of *Bacillus cereus* biofilm formation. Applied and environmental microbiology ; Vol. 68, No. 6 : 2950-2958.
- **Derjaguin B, Landau L. (1941).** Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. Acta Physico-Chemica URSS, 14, pp 633.
- **Dickson JS, Daniels EK. (1991).** Attachment of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* to glass as affected by surface film thickness, cell density, and bacterial motility. Journal of Industrial Microbiology, 8, pp 281-284.
- **Donlan RM, Costerton JW. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiological Reviews, 15, pp 167-193.
- **Drobniewski FA (1993).** *Bacillus-cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews* 6 : 324-338.

-E-

- **Enyedi AJ, Yalpani N, SilvermanP,Raskin I.(1992).**Localisation conjugation and function of salicylicacid in tobaccoduring the hyper sensitive reaction .Proc Natl Acad Sci USA,89 :2480-2484.

-F-

- **Farmer ,E.E.,Weber, H.,Vollenweider, S., (1998).**Fatty acid singnaling in Arabidopsis Planta, 206 :167-174.
- **Fasquelle R.,(1968).** Bactériologie médicale :148-153

**-G-**

- **Guinebretière *et al.*, (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Environ. Microbiol. 10, 851-865.
- **Ghigo JM. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature, 412:6845, pp 442-445
- **Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, Tolker-Nielsen T. (2005).** Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas* putidabiofilms. Environmental Microbiology, 7:6, pp 894-906.
- **Gray K.M. (1997).** Intercellular communication and group behavior in bacteria. Trends Microbiol 5: 184-188.
- **Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J. (1993).** Requirement of salicylic acid for the induction of system acquired resistance. Science 261 :754-756.

**-H-**

- **Hauge, S. (1995).** Food poisoning caused by aerobic spore-forming *Bacilli*. *Journal of Applied*.
- **Hugas M., Garriga M., Monfort J.M. (2002).** New mild technologies in meat processing ; high pressure as a model technology. Meat Science, 62, 359-371.
- **Herrmann K, Weaver LM .(1999).** The shikimate pathway. Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol .Bio, 50 :473-503.

**-I-**

- **INVS (2011).** Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de déclaration obligatoire, 2009.

**-J-**

- **Jouenne T. 2008 :** Biofilms bactériens. technique d'ingénieur. bio 600 : 1-8.

- **Ji G, Beavis R, Novick R.P. (1997).** Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276: 2027-2030.

## **-L-**

- **Lequette Y, Garenaux E, Tauveron G, et al. (2011).** Role Played by Exosporium Glycoproteins in the surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology* 77 : 4905-4911 .
- **Lowy FD. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339 :520-532
- **Pasteur L. (1877).** A propos de deux malades soignés à l'hôpital Saint-Louis pour pustule maligne : 21-43.
- **Liesse Iyamba J-M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- **Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, aguilar C, Kolter R. (2008).** Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*,322, pp 1-16.
- **Loake G, Grant M. (2007).** Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* ,10 :466-472.
- **Leon J, Shulaev V ,Yalpani N, Lawton MA, Rasin I.(1995).** Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 :10413-10417.
- **Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C.(1996).** Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive resistance response. *Cell*,79 :583-593.

## **-M-**

- **Mei Lin Da, Aron K. Heroux, Zahra Pakzad, and Karl F.E.S (2010).** Shiffmacher *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol 14 :69-73.
- **Musk D.J., Bako D.A., and Hergenrother P.J. (2005).** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Bacillus cereus* . *Chemistry & Biology* ; Vol. 12 : 789-796.
- **Méar J-B. (2014).** Etude de la modulation de la virulence de *Staphylococcus aureus* par *Candida albicans* dans un modèle de *pneumonie*. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, France.

- **Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss Benz, M., Gaudin J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B., (1990).** Increase in salicylic acid at the onset of system acquired resistance. *Sci. 250* :1004-1006.
- **Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. and Raksis, I., (1990).** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Sci. 250* :1004-1002.
- **Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Hass, D. and Reimann, C. (2001).** Manipulation of salicylic content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J. 25(1)* :62-77.
- **Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. (1988).** Antifungal hydrolases in pea. // Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiol*, 88 :936-942
- **Mikolajczyk, M., Awotunde, O.S., Muszynska, G., (2000).** Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cell. *Plant Cell*, 12 :165-178.
- **Mehdy MC. (1994).** Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 105 :467-472.

## -N-

- **Nagant C. (2013).** Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de *B.cereus* et *S.aureus*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- **Niderman T, Genet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fntig B, Mosinger E. (1995).** Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-Kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol*, 108 :17-27.

## -O-

- **Otto M. (2008).** *Staphylococcal* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, pp 207-228.

- **Oncle, S., pinar, E., Sener, G., Calli, C., Karagoz, U. (2010).** Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosin Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. J. Otolaryngol. Head Neck Surg. 39 : 52- 55.

## **-P-**

- **Phillips PL, W. RD, Fletcher J, Schultz GS.(2011) :** Biofilms made easy. Wounds international 01(03).
- **Pratt LA, Kolter R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility , chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology, 30:2, pp 285-293
- **Prigent-Combaret C, Lejeune P. (1999).** Monitoring gene expression in biofilms. Biofilms, Methods in Enzymology, 310, pp 56-79.
- **Parsek MR, Greenberg EP. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in Microbiology, 13:1, pp 27-33.
- **Parot S. (2007).** Biofilm électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctotrat. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- **Pieterse CMJ.(2001).**Rhizobacteria-medatedinducedsystemicresistance :triggering, singalling and expression. Eur.J.PlantPathol. 107(1) :51-61.
- **PaninaYS,GerasimovaNG,Chalenko GI, Vasykova NI, Ozeretskovskaya OL.(2004).**Salicylic Acid and Phenylalanine Ammonia-Lyase in Potato Plant Infected with the causal Agent of LateBlight.Russian Journal of plant Physiology.52 :511-515.

## **-R-**

- **Raskin I. (1992a)**Role of salicylic acid in plants. ANNUAL Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43 :439-463.
- **Raucher M, Adam AL, Wirtz S, Guggenheim R,Mendgen K, Deising HB. (1999).**PR-1 protein inhibis the differentiation of rust infection hyphae in leaves of resistant broadbean. Plant J,19 :625-633.
- **Ruffer M, Steipe B, Zenk MH.(1995).**Evidence against specific binding of salicylicacid to plant catalase.FEBSLetters,377 :175-180.

**-S-**

- **Sutherland IW. (2001).** The biofilm matrix -an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9:5, pp 222-227.
- **Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184:4, pp 1140-1154
- **Spormann AM. (2008).** Physiology of microbes in biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, pp 17-36.
- **Stoodley P, Boyle JD, Dodds I, Lappin-Scott HM. (1997).** Consensus model of biofilm structure. In *Biofilms: community interactions and control*, Eds Wimpenny JWT, Gilbert PS, Lappin-Scott HM, Jones M, Cardiff, United-Kingdom, pp 1-9.
- **Shah J, Klessing D.F.(1999).** Salicylic acid :signal perception and transduction .In :Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R., eds. and molecular biology of plant hormones .Amsterdam :Elsevier Science Publications, 513-541.
- **Salzman.RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bessan RA.(1998).** Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape .*Plant physiology*, 117 :465-472.

**-T-**

- **Thormann KM, Duttler SA, Saville R, Hyodo M, Shukla S, Hayakawa Y, Spormann AM. (2006).** Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic-di-GMP. *Journal of Bacteriology*, 188:7, pp 2681-2691.
- **Tomlin KL, Malott RJ, Ramage G, Storey DG, Sokol PA, Ceri H. (2005).** Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:9, pp 5208-5218.

**-V-**

- **Van Lossdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schroa G, Zehnder AJB. (1987).** The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, pp 1893-1897.

- **Van Houdt R, Michiels CW. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156:5-6, pp 626-633.
- **Vasyukova, NI, Ozeretskoykaya OL. (2007).** Induced Plant Resistance and Salicylic Acid: Review. *App. Biochem. Microbiol*, 43 :367-373.
- **Vasyukova, NI, Gerasimova NG, Ozeretskoykaya OL. (1999).** *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 35 :557-563.
- **Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J. (1994).** Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing system acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, 6 :959-965.

## -W-

- **Weigel LM., Clewell DB., Gill SR. (2003).** Genetic analysis of high-level vancomycin-resistant isolate of *Bacillus cereus*. *Science* 302 :1569-1571.
- **Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming HC. (2001).** Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. In *Methods in Enzymology, Microbial growth in biofilms, PT A: Developmental and molecular biological aspects*, Eds Doyle RJ, Elsevier Academic press Inc, USA, 336, pp 302-314
- **Wolz C, Oohlmann-Dietze P, Steinhuber A, Chien Y.T, Manna A, Van Wamel W, Cheung A (2000).** Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 36 :230-243.
- **Ward E.R., S. Uknes, S.C. Williams, S.S. Dincher, D.L. Wiederhold, D.C. Alexander, P. Ahl-Goy, J.P. Métraux and J.A. Ryals. (1991).** Coordinate gene activity in response to agents that induce system acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- **Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M. (2001).** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* .414(6863) :562-565.

**-Y-**

- **Yalpani N, Leon J ,Lawton MA ,Raksin I.(1993).**Patway of salicylic – acidbiosynthesis in healthy and virus –inoculatedtobacco.Plant Physiol,103 :315-321.
- **Yang, L., M. T. Rybtke, T. H. Jakobsen, M. Hentzer, T. Bjarnsholt, M.Givskov, and T. Tolker-nielsen.(2009).** Coputer- aided identification of recognized drugs as *staphylococcus aureus* quorum-sensing inhibitors. Antimicrib. Agents Chemother.53 :2432-2443.

**-Z-**

- **Zhang,S., Du, H., Klessing, D.F.(1998).**Activation of the tobacco SIP kinase by both a cellwall-derived carbohydrate elicitorpurifiedproteinaceousfrom phytophthora spp.Plant Cell,3 :435-450.



## Résumé

*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont des pathogènes opportunistes responsables des toxi-infections alimentaires dans une partie est due à leurs capacité de coloniser beaucoup de surfaces biotiques et abiotiques. Ces toxi-infections persistantes peuvent être difficiles à traiter en raison d'un grand répertoire de facteur de virulence, et les capacités d'organisation pour former des biofilms. Le protocole suivi nous a permis et d'une façon très claire de démontrer le taux de formation du biofilm bactérien par *B.cereus* et *S.aureus* au cours du temps d'incubation par la méthode cristal violet. Beaucoup de facteurs dans la formation de biofilm sont également impliqués dans l'inhibition. Dans notre travail avons étudié l'effet inhibiteur de l'acide salicylique sur l'adhérence et la croissance planctonique des deux espèces *S.aureus* et *B.cereus* (dix isolats). Les résultats ont montré que les différents isolats de *Bacillus cereus* testés ont exhibé une capacité à former et à s'adhérer aux supports testés comparativement aux isolats de *S.aureus*. Le nombre de cellules de *B.cereus* attachées a atteint (DO = 1,6) et celui de *S.aureus* est de (DO =1,4) en suspension. L'analyse testée sur l'effet inhibiteur de l'acide salicylique a prouvé que les concentrations testées d'acide salicylique diminuent la croissance bactérienne planctonique des isolats de *S.aureus* et *B.cereus* avec des valeurs de densité optique (DO) de .....et.... respectivement. Ces résultats ont été corrélés avec une diminution significative dans la formation des biofilms matures formés par les différents isolats étudiés, avec des taux d'inhibition de 9% et % respectivement, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 2,76 mM.

**Mot clés :** Toxi-infections, *S.aureus* , *B.cereus*, Biofilm, Acide salicylique.

## summary

*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* are opportunistic pathogens responsible for foodborne illness in part is due to their ability to colonize many biotic and abiotic surfaces. These persistent poisoning can be difficult to treat because of a large virulence factor directory, and organizational capacity to form monitoring protocol biofilms. Le helped us and in a very clear way to demonstrate the rate of formation of bacterial biofilm per *B.cereus* and *S.aureus* during the incubation time by the crystal violet method. Many factors in biofilm formation are also involved in inhibition. In our work we studied the inhibitory effect of salicylic acid on adhesion and planktonic growth of both species *S.aureus* and *B.cereus* (ten isolates). The results showed that different isolates of *Bacillus cereus* tested exhibited an ability to form and to join the tested materials compared to isolates of *S.aureus*. The number of cells attached to *B.cereus* reached% and *S.aureus* is % suspension. The analysis tested the inhibitory effect of salicylic acid has proved that the salicylic acid concentrations tested reduced bacterial growth planktonic *S. aureus* isolates and *B.cereus* with optical density values (DO) of ... ..and.... respectively. These results were correlated with a significant decrease in the formation of mature biofilms formed by different isolates studied, with% inhibition rate and% respectively, with a minimum inhibitory concentration (CMI) of 2.76 mM.

**Key words :** Borne infections, *S.aureus*, *B.cereus*, Biofilm, salicylic acid.

## ملخص

المكورات العنقودية الذهبية والشمعية عصبية من مسببات الأمراض الانتهازية المسؤولة عن الأمراض التي تنقلها الأغذية ويرجع ذلك إلى قدرتها على استعمار العديد من الأسطح الحيوية وغير الحيوية. هذه الأمراض يمكن أن يكون من الصعب علاجها بسبب دليل عامل **الوقعة** كبير، والقدرة التنظيمية لتشكيلها للبيوفيلم، البروتوكول قدم لنا بطريقة واضحة جدا للتدليل على معدل تشكيل التجمعات البكتيرية في *S.aureus* و *B.cereus* خلال فترة الحضانة من خلال طريقة واضحة **فوق البنفسجية**. وتشارك العديد من العوامل في تشكيل بيوفيلم أيضا في تثبيط. في عملنا قمنا بدراسة تأثير مثبط للحمض الساليسيليك على التصاق ونمو العوالم من كلا النوعين *S.aureus* و *B.cereus* (عشرة العزلات). وأظهرت النتائج الاختبار أن عزلات مختلفة من الشمعية عصبية لها القدرة على تشكيل والانضمام إلى اختبار المواد مقارنة مع العزلات من *S.aureus*. بلغ عدد خلايا تعلق على *B.cereus* و *S.aureus* هو% تعليق. اختبار التحليل أثبتت تأثير كاجح من حمض الصفصاف أن تركيزات حمض الساليسيليك اختبار انخفاض العوالم نمو البكتيريا العنقودية الذهبية المعزولة و *B.cereus* مع قيم الكثافة الضوئية (DO) من ... .. و .... على التوالي. كانت مرتبطة مع هذه النتائج حدوث انخفاض كبير في تكوين الأغشية الحيوية الناجمة التي شكلتها مختلف العزلات المدروسة، مع معدل% تثبيط و% على التوالي، مع الحد الأدنى من تركيز مثبط (MIC) من 2.76 ملم.

**الكلمات المفتاحية :** *S.aureus*، *B.cereus*، بيوفيلم، حمض الصفصاف