

Chapitre 1 : Biofilms

1.1 Composition des biofilms

Typiquement, les biofilms incluent les bactéries et leur matrice extracellulaire. Tel que représenté à la Figure 1-1, la matrice extracellulaire est principalement composée de différentes biomacromolécules telles que les polysaccharides, protéines et glycoprotéines [1, 21]. On peut aussi y retrouver des lipides et de l'ADN et ARN extracellulaires, quoiqu'en plus faible quantité. La composition exacte varie amplement selon le type de bactérie et l'environnement du biofilm. Par exemple, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* exprime le polysaccharide cationique Pel qui se lie à l'ADN et l'ARN extracellulaires, modifiant ainsi les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire [21, 22].

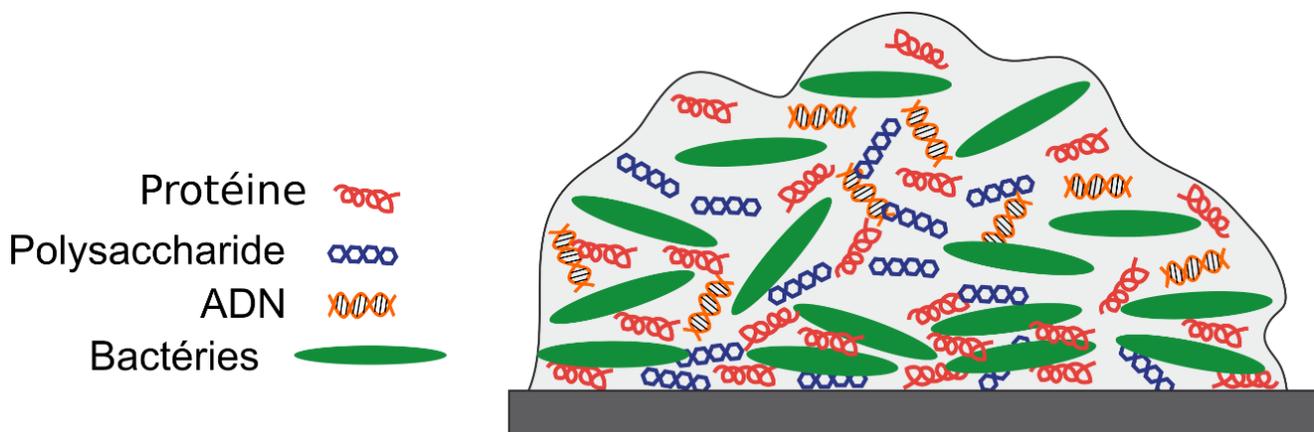


Figure 1-1 : Schéma représentant la composition d'un biofilm. Les différentes composantes (protéines, polysaccharides, ADN et bactéries) ne sont pas représentatives de la répartition exacte retrouvée dans un biofilm. Certaines molécules retrouvées dans les biofilms ne sont pas représentées.

La matrice extracellulaire confère une cohésion importante au biofilm. Elle a de bonnes propriétés viscoélastiques et les bactéries ont la possibilité de moduler ses

propriétés mécaniques en réponse à un stress externe. Après une augmentation des forces de cisaillement imposées, le temps de relaxation élastique des biofilms est 18 minutes [23]. Ce temps de réponse à un stress imposé aux biofilms est commun pour plusieurs espèces et correspond au temps de réponse phénotypique des bactéries à un changement d'environnement chimique. De plus, il a été démontré que les propriétés mécaniques de plusieurs biofilms sont affectées par la présence de certains sels. L'ajout de cations monovalents (Na^+ et K^+) et divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) dans un milieu augmente la viscosité apparente des biofilms de *Pseudomonas* alors que les ions trivalents (Fe^{3+} et Al^{3+}) la diminuent [24-26]. Dans le cas des ions monovalents et divalents cet effet est relié à une perturbation des forces électrostatiques et hydrophobes. En temps normal, les ions divalents permettent de réticuler et de rigidifier les polysaccharides de la matrice extracellulaire tel que l'alginate. Dans ce cas, cet effet est observé puisque dans un biofilm mature la matrice extracellulaire est complètement saturée en ions divalents. Les ions trivalents peuvent rigidifier un biofilm puisque ces derniers ne sont généralement pas saturés à maturité.

Les biofilms peuvent modifier leur environnement en favorisant la dissolution ou la précipitation de certains minéraux [2]. Ils peuvent aussi bloquer un milieu poreux ou des tuyaux, ce qui entraîne une modification de l'écoulement. La présence de différentes biomolécules et de molécules organiques adsorbées dans le biofilm en fait aussi une bonne source de nourriture pour les bactéries pour les périodes où l'environnement change pour un milieu pauvre en matière organique [27].

1.2 Croissance des biofilms

Tel que représenté à la Figure 1-2, le modèle classique utilisé pour représenter la croissance des biofilms comprend les cinq étapes suivantes : attachement initial réversible de bactéries, formation de microcolonies en surface et attachement irréversible, croissance rapide des colonies bactériennes, maturation du biofilm et

finalement, rupture du biofilm ou libération de bactéries à partir des microcolonies [28]. Il a été récemment démontré que la libération des bactéries se produit à toutes les étapes de la croissance des biofilms [8]. Malgré les travaux faits au cours des dernières années pour mieux connaître les biofilms, ces différentes étapes ne sont pas encore bien comprises. Les premières étapes de croissance (attachement initial, formation de microcolonies et croissance rapide) sont déterminantes pour la structure du biofilm final et nécessitent d'être étudiées davantage.

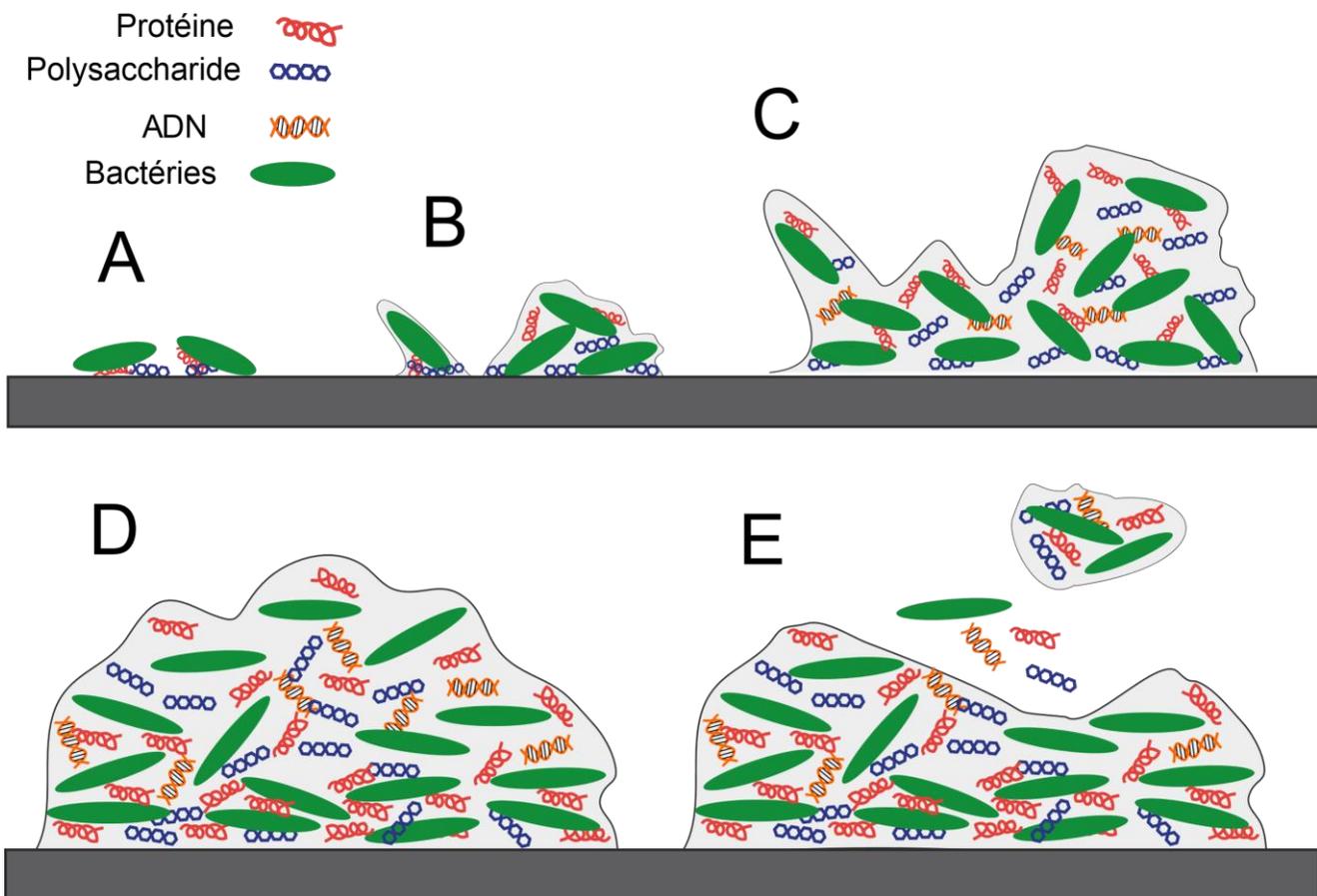


Figure 1-2 : Modèle représentant les étapes de croissance : A) attachement initial réversible. B) formation de microcolonies et attachement irréversible, C) croissance rapide des colonies, D) biofilm mature et E) rupture partielle ou complète du biofilm.

D'abord, lors de l'attachement initial réversible des bactéries, ces dernières s'attachent directement à la surface où à une couche de conditionnement à l'aide de

glycoprotéines présentes à leurs surfaces. La couche de conditionnement est généralement constituée de différentes biomolécules telles que les protéines et les polysaccharides. Elle est produite par les bactéries ou autres organismes présents dans le milieu environnant. La formation de la couche de conditionnement est cruciale pour l'attachement initial des bactéries sur les surfaces qui ne sont pas propices à l'attachement et la croissance. Cela permet, entre autres, à certains biofilms de se former sur des surfaces antiadhésives comme le téflon [29]. À cette étape, les bactéries sont encore légèrement mobiles et peuvent se retirer de la surface. Ensuite, chaque bactérie qui a adhéré à la surface commence à se répliquer pour former une microcolonie. À cette étape, il y a une production importante de glycoprotéines permettant l'adhésion irréversible à la surface [30]. Lorsque les conditions sont propices, il y a réplification rapide des bactéries et production de la matrice extracellulaire. Par la suite, les microcolonies mûrissent et forment différents types de structures en fonction de leur environnement et du type de bactéries. Lorsque les biofilms sont matures, il peut y avoir rupture partielle du biofilm, ce qui provoque sa dispersion. Il est important de noter que la dispersion du biofilm peut aussi se produire pendant chaque étape de sa croissance [8].

Lors des différentes étapes de croissance des biofilms, leur composition varie grandement. Plusieurs facteurs influencent la dispersion comme les forces de cisaillement, certaines enzymes pouvant dégrader la matrice extracellulaire, la présence de surfactants ou de chélatants, des molécules induisant un signal de détection du quorum et le changement des conditions environnementales. Ce dernier facteur inclut la concentration en oxygène et en nutriments [5]. Les biomolécules impliquées dans le conditionnement de la surface et l'adhésion initiale sont différentes de celles retrouvées dans les bactéries et dans le biofilm. De plus, les changements du métabolisme des bactéries se traduisent par une variation dans la concentration en biomolécules comme les protéines, les polysaccharides, les phospholipides et les acides nucléiques. Ces changements ne sont pas observables directement en microscopie en champ clair et en microscopie à fluorescence. Pour cette raison, l'utilisation de techniques comme la spectroscopie infrarouge pendant

la croissance se révèle utile pour mieux suivre ces effets [31, 32]. Par ailleurs, il est important de considérer que ces étapes ne sont pas parfaitement définies. Ainsi, plusieurs étapes peuvent se chevaucher en même temps pour un biofilm sur une même surface. De multiples facteurs entrent en jeu dans la croissance des bactéries. De ce fait, certains matériaux favoriseront l'attachement alors que d'autres l'inhiberont. Sur un même substrat, les défauts en surface ont tendance à servir de point de départ pour l'attachement initial. L'environnement chimique (concentration en nutriments, agents pathogènes, biomolécules, molécules impliquées dans la détection du quorum) et physique (vélocité du liquide, topologie du substrat, forces de cisaillement, gradients de concentration) est déterminante pour la transition entre ces phases et favorise certains phénotypes dans des parties du biofilm. Le comportement global du biofilm est régi par un mécanisme complexe impliquant la communication entre les organismes qui le composent. Il peut y avoir communication à partir de différents médiateurs tels que de l'ADN extracellulaire et certains dérivés d'acides nucléiques. Un des processus les plus importants est la détection du quorum (*Quorum sensing*) [28, 33, 34].

1.3 Transfert de masse dans les biofilms

La manière dont les biofilms interagissent avec leur environnement est différente des bactéries planctoniques. Pour les bactéries planctoniques nageant librement dans un milieu aqueux, les phénomènes de diffusion ont une importance limitée. Les mouvements des bactéries leur permettent en effet de se déplacer en direction des endroits où la concentration en nutriments est plus élevée en fonction du gradient de concentration dans le milieu [35]. Leurs mouvements sont aussi affectés par la présence de surfaces. Il a aussi été démontré que le mouvement des bactéries planctoniques favorise le mélange dans la solution [36]. De plus, lorsque des bactéries se retrouvent dans un milieu turbulent, le principal mécanisme de transfert de masse est la convection et le mélange est efficace. Puisque le biofilm forme une

barrière physique empêchant les phénomènes de turbulence, les transferts de masse se font essentiellement par diffusion.

Dans un milieu où la diffusion est le principal mécanisme de transfert de masse, on peut considérer que la diffusion d'une molécule ou d'un ion est décrite par son coefficient de diffusion en milieu aqueux (D_{aq} ; m^2s^{-1}) [37]. Cela est seulement le cas si la diffusion n'est pas limitée par une autre substance. Le coefficient de diffusion effectif (D_e ; m^2s^{-1}) dans le biofilm sera toujours plus faible que celui en milieu aqueux à cause de la présence des bactéries, de la matrice extracellulaire et de toute particule ou bulle trappée par le biofilm. On retrouve d'autres facteurs limitants pour le transfert de masse dans un biofilm qui sont reliés au rôle actif des bactéries. Pour les molécules pouvant être consommées ou dégradées par le biofilm, la concentration à l'intérieur du biofilm prendra un temps plus élevé pour augmenter. Ainsi, on peut retrouver des zones très pauvres en nutriment ou en oxygène dans un biofilm [38, 39]. Plusieurs biofilms multi-espèces tirent profit de cet effet. Les biofilms mixtes contenant des bactéries aérobies, des fermenteurs et des anaérobies sont formés grâce au gradient d'oxygène produit. Dans les couches supérieures, on retrouve les bactéries aérobies qui ont besoin d'oxygène pour leur métabolisme. Lorsque la concentration d'oxygène est faible, on retrouve des microorganismes utilisant la fermentation comme mode de production d'énergie. Dans les couches inférieures du biofilm, alors que tout l'oxygène a été consommé, on peut alors retrouver des bactéries anaérobies qui utilisent différents mécanismes impliquant des molécules autres que l'oxygène comme accepteur d'électrons pour la respiration cellulaire. La matrice extracellulaire impose une barrière pour le transfert de masse par diffusion et convection autant pour les molécules pénétrant le biofilm (nutriments, antibiotiques, biomolécule ou autres) que pour celles produites par les bactéries et devant être excrétées (métabolites). La présence de trous dans le biofilm peut augmenter le transfert de masse en favorisant la convection lorsque la vitesse de l'écoulement est grande [6, 7]. Dans ces conditions, la convection est le mode de transfert de masse dominant [40]. Pour certaines communautés bactériennes, certains mécanismes symbiotiques peuvent prendre

place. Dans ce cas, certains produits de dégradations d'un microorganisme peuvent être utilisés par d'autres espèces lors de leur métabolisme.

Bien que l'on considère que toutes les bactéries dans les biofilms soient sessiles, il a été démontré que pour certaines bactéries, il peut y avoir entre 0,1 et 1% de bactéries mobiles. Elles forment une sous-population au sein même du biofilm et peuvent nager à l'intérieur de pores, favorisant ainsi le transfert de masse dans la matrice extracellulaire [41]. Alors que pour des fins de simplification on considère les biofilms comme des agrégats de bactéries entourés d'une matrice extracellulaire, ils possèdent une structure interne complexe. On retrouve en effet des réseaux poreux interconnectés dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* qui facilitent le transfert de nutriments et l'élimination des déchets [42, 43].

1.4 Impact des biofilms sur la résistance des bactéries aux environnements hostiles

Les bactéries peuvent développer une résistance aux environnements hostiles au travers de différents mécanismes et les biofilms en font partie [44]. Les caractéristiques qui permettent de survivre à ces conditions peuvent être acquises par des mutations génétiques et seront transmises aux générations suivantes. Un des facteurs importants est relié à la tolérance accrue aux agents antibactériens dans la forme biofilm [18]. La tolérance correspond à l'habilité à survivre à l'exposition à un composé qui serait létal pour un organisme ne possédant pas ce trait. Ce phénomène est réversible et spécifique aux biofilms [3]. Un des mécanismes importants implique la diminution de la concentration effective des agents antimicrobiens dans le biofilm. La concentration élevée en polysaccharide et la présence d'acides humiques dans la matrice extracellulaire font qu'il y a une grande diversité de groupements fonctionnels dans l'environnement des bactéries. Les acides humiques sont des polyphénols de structure complexe. Ils peuvent être

produits par les bactéries par dégradation de la lignine se trouvant dans l'environnement [45]. Les nanoparticules organiques et inorganiques peuvent aussi être trappées dans les biofilms [46]. Plusieurs composés toxiques et diverses molécules se retrouvent trappés par la matrice extracellulaire [47, 48]. Donc, bien qu'une zone du biofilm soit exposée à une concentration élevée de ces composés, le gradient de concentration qui y est formé fait que certaines régions du biofilm sont soumises à des concentrations suffisamment faibles pour ne pas affecter les bactéries. Celles qui survivent à ces doses plus faibles sont alors susceptibles de transmettre certains gènes favorisant la résistance à ces composés. Cela s'applique pour les molécules organiques ainsi que pour certains métaux toxiques comme le mercure, le cuivre, le cadmium et le zinc [47-49]. Les micro-organismes peuvent aussi sécréter des enzymes dans la matrice extracellulaire afin de dégrader différentes molécules qui leur sont nocives. Cette capacité à fixer les métaux lourds et à dégrader des molécules organiques toxiques les rend intéressants pour la bioremédiation des eaux usées [48]. Ces effets combinés créent un gradient de concentration dans le biofilm. Plus une bactérie est enfouie dans le biofilm, plus la concentration effective en oxygène et en nutriments essentiels est faible. Cela fait que les bactéries se trouvant dans les couches inférieures sont souvent en état de dormance afin de réduire leur métabolisme, donc ont peu d'activité biochimique [3]. Puisque plusieurs antibactériens dépendent de l'activité de la bactérie, elles peuvent survivre et reformer le biofilm lorsqu'elles redeviennent actives et que les conditions redeviennent propices à leur multiplication. Les traits permettant à ces bactéries de mieux tolérer ces environnements sont ensuite hérités par les générations suivantes, les rendant ainsi résistantes.

Puisque le biofilm est fixé à un substrat, il peut être soumis à un changement soudain de son environnement. La matrice extracellulaire offre une tolérance accrue face à ces changements. Dans le cas où un biofilm se retrouve dans un milieu sec, il y aura production plus importante de polysaccharides spécifiques. Ces derniers ont la propriété d'absorber et de retenir l'eau. De plus, la couche supérieure de la matrice extracellulaire forme une sorte de peau lorsqu'elle sèche. Cela limite l'évaporation

de l'eau et protège ainsi le biofilm de la déshydratation [2, 30]. Certains polysaccharides hautement branchés inspirés de ceux produits dans la matrice extracellulaire peuvent même être utilisés sous forme de nanoparticules pour de nouvelles technologies et thérapies, notamment pour des crèmes hydratantes [50]. En cas de manque de nutriments et de molécules organiques à consommer pour assurer le métabolisme des bactéries, ces dernières peuvent sécréter des enzymes pour dégrader partiellement la matrice extracellulaire. Cela a pour effet de rendre disponible ces ressources pour les bactéries. Cela facilite aussi la rupture partielle du biofilm et l'éjection des bactéries. Ces dernières pourront alors se disperser dans le milieu environnant et former un nouveau biofilm à un endroit où les ressources sont suffisantes [2, 5].

1.5 Effet de l'écoulement sur les biofilms

Tel qu'énoncé précédemment, les biofilms sont très sensibles aux conditions environnementales. Un des facteurs importants est la présence ou l'absence d'un écoulement. De plus, les biofilms se comportent différemment si l'écoulement est laminaire ou turbulent. Le débit joue aussi un rôle important. Il a été démontré pour les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* qu'une plus grande concentration de bactéries se retrouve dans les couches supérieures du biofilm. De plus, lorsque le débit augmente, la proportion des bactéries dans le biofilm diminue. Enfin, les biofilms formés en présence d'un flux laminaire se développent plus facilement, mais ont moins de bactéries par unité de volume que ceux formés en présence d'un flux turbulent [51]. Ces changements peuvent aussi favoriser la formation de certaines structures dans le biofilm. En effet, la forme du biofilm a un effet important pour la diffusion et la convection. Une partie de ces effets sont reliés au transfert des nutriments et des déchets au sein du biofilm. Les nutriments présents dans le milieu environnant le biofilm sont davantage disponibles pour les bactéries des couches supérieures du biofilm puisqu'elles sont les premières à y avoir accès. La diffusion des déchets est aussi limitée dans les couches inférieures [8]. Les bactéries ont la

possibilité de modifier dynamiquement les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire par l'ajout, la modification ou la dégradation de différentes biomolécules en réaction à l'écoulement.

[Mycours.com](https://www.mycours.com)