

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-------------|
| REMERCIEMENTS | iii |
| TABLE DES MATIERES | v |
| LISTE DES ABREVIATIONS | vii |
| GLOSSAIRE | viii |
| LISTE DES FIGURES | x |
| LISTE DES TABLEAUX | xi |
| LISTE DES ANNEXES | xi |
| INTRODUCTION | 1 |
| PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHYQUE | 3 |
| I. LE BIOFILM | 3 |
| I.1. Historique | 3 |
| I.2. Définitions | 4 |
| I.3. Formation..... | 4 |
| I.3.1. Adhésion réversible | 5 |
| I.3.2. Adhésion irréversible..... | 6 |
| I.3.3. Formation de micro-colonies | 6 |
| I.3.4. Phase de maturation | 6 |
| I.3.5. Phase de dispersion..... | 7 |
| I.4. Composition de la matrice du biofilm | 7 |
| I.5. Structure et architecture du biofilm | 7 |
| I.6. Facteurs favorisant la formation du biofilm | 8 |
| I.7. Résistance bactérienne à divers agents antimicrobiens liés au biofilm | 8 |
| I.8. Utilités du biofilm..... | 9 |
| I.9. Conséquences néfastes du biofilm..... | 9 |
| I.10. Moyens de lutte contre les biofilms | 10 |
| II. LES SOUCHES BACTERIENNES | 10 |
| II.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 |
| II.1.1. Généralités..... | 10 |
| II.1.2. Biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 |
| II.2. <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| II.2.1. Généralités..... | 12 |
| II.2.2. Biofilm d' <i>Escherichia coli</i> | 13 |

| | |
|--|-----------|
| II.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 14 |
| II.3.1. Généralités..... | 14 |
| II.3.2. Biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 15 |
| PARTIE II : MATERIELS ET METHODES | 17 |
| I. LES MATERIELS..... | 17 |
| I.1. Souches bactériennes | 17 |
| I.1.1. Conservation..... | 17 |
| I.2. Milieux de culture..... | 17 |
| I.3. Matériels et équipements de laboratoire | 17 |
| II. METHODES..... | 18 |
| II.1. Préparation du milieu de culture | 18 |
| II.1.1. Milieu complexe..... | 18 |
| II.1.2. Milieu minimum..... | 19 |
| II.2. Préparation de la suspension bactérienne | 19 |
| II.2.1. Modes opératoires | 19 |
| II.3. Culture sur plaques de 96 puits | 20 |
| II.3.1. Principe..... | 20 |
| II.3.2. Modes opératoires | 21 |
| PARTIE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS | 24 |
| I. FORMATION DU BIOFILM PAR <i>Staphylococcus aureus</i> | 24 |
| I.1. En milieu complexe | 24 |
| I.2. En milieu minimum | 24 |
| II FORMATION DU BIOFILM PAR <i>Escherichia. coli</i>..... | 25 |
| II.1. En milieu complexe..... | 25 |
| II.2. En milieu minimum..... | 26 |
| III. FORMATION DU BIOFILM PAR <i>Pseudomonas. aeruginosa</i>..... | 27 |
| III.1. En milieu complexe | 27 |
| III.2. En milieu minimum | 28 |
| DISCUSSION..... | 28 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERPECTIVES..... | 29 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 32 |
| ANNEXES..... | I |
| RESUME | |
| ABSTRACT | |

LISTE DES ABREVIATIONS

Ag43 : Antigène 43

AI-2 : Auto-inducteur 2

BAF: Biofilm Associated Protein

CV: Crystal Violet

E. coli : *Escherichia coli*

EPS: ExoPolymeric Substances

IgG : Immunoglobulines G

LB: Luria Bertanie

LB-MOPS: Luria Bertani-MOPS

MOPS : Acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique

MPOC : Maladies Pulmonaires Obstructives Chroniques

NAHL : N-acylhomosérine lactones

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PGA: Poly-β-1,6-N-acétyl-glucosamine

pH : Potentiel d'hydrogène

PIA : Adhésine Intercellulaire Polysaccharidique

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SBF : Formation du Biofilm Spécifique

GLOSSAIRE

Aéro-anaérobie : adjectif désignant un microorganisme capable de se développer en présence ou en absence d'oxygène.

Aérobic : adjectif désignant un microorganisme qui se développe en présence d'oxygène.

Bactérie saprophyte : bactérie qui ne se développe pas dans un organisme vivant, mais se nourrit des déchets générés au sein de celui-ci.

Bactérie opportuniste : bactérie qui ne provoque habituellement pas de maladie mais qui peut devenir pathogène dans certaines conditions, lorsque le système immunitaire et la résistance de l'individu sont affaiblis.

Bioremédiation : ensemble de techniques utilisées pour dépolluer un site naturel (sol, sédiments, eaux de surface ou souterraines), mais qui font appel à l'utilisation de microorganismes, de champignons, de végétaux divers ou d'enzymes qu'ils produisent.

Chimiotactisme : effet d'attraction ou répulsion qu'exerce une substance chimique sur une cellule vivante.

Cycle de carbone : cycle biogéochimique (ensemble des échanges d'un élément chimique) du carbone sur une planète.

Cycle de l'eau : phénomène naturel qui représente le parcours entre les grands réservoirs d'eau liquide, solide ou de vapeur d'eau sur Terre, dont les océans, l'atmosphère, les lacs, les cours d'eau, les nappes d'eaux souterraines et les glaciers.

Division binaire : forme de reproduction ou de division cellulaire la plus commune des procaryotes, qui donne deux cellules filles semblable à la cellule mère.

Fibrose kystique : maladie génétique qui touche principalement le poumon et le système digestif.

Infection nosocomiale : infection contractée au cours d'une hospitalisation, qui n'existait pas auparavant ni, d'ailleurs, durant les 48 premières heures à l'hôpital.

Personne immunodéprimée : personne qui présente un déficit du système immunitaire, c'est-à-dire une insuffisance des moyens de défense naturels ou spécifiques de l'organisme. Le sujet n'est plus capable de faire face correctement à une infection microbienne.

Protrusion : état anormal d'un organe (ou d'une partie d'un organe) poussé en avant à la suite d'un processus pathologique (affection quelconque).

Qualité organoleptique d'un aliment : propriété typique sensorielle d'un aliment se rapportant à des propriétés sensorielles ou chimiques d'un aliment particulier. Son goût, l'apparence et la couleur, l'arôme, la taille et la fermeté et même les sons (par exemple, le « claquement » ou le « croquant » en mordant dans une pomme).

Quorum Sensing : mécanisme de régulation remarquable de l'expression de certains gènes mis en évidence chez les bactéries, qui correspond à un mode de communication entre bactéries d'une même espèce et d'espèces différentes.

Surfaces abiotiques : matériaux inertes, dont des implants médicaux, des tubes en acier, le sol.

Surfaces biotiques : tissus ou cellules vivants, dont des cellules épithéliales par exemple.

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Les étapes de la formation du biofilm | 5 |
| Figure 2 : <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 |
| Figure 3 : <i>Escherichia coli</i> | 13 |
| Figure 4 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 15 |
| Figure 5 : Absence du biofilm..... | 21 |
| Figure 6 : Biofilm à peine visible dans chaque puits | 22 |
| Figure 7 : Biofilm formé sur la paroi de la plaque | 22 |
| Figure 8 : Biofilm formé sur la paroi et le fond du tube | 23 |
| Figure 9 : Biofilm formé sur toute la surface du puits | 23 |
| Figure 10 : Formation du biofilm en milieu complexe pour <i>S. aureus</i> | 24 |
| Figure 11 : Formation du biofilm en milieu minimum pour <i>S. aureus</i> | 25 |
| Figure 12 : Formation du biofilm en milieu complexe pour <i>E. coli</i> | 26 |
| Figure 13 : Formation du biofilm en milieu minimum pour <i>E. coli</i> | 26 |
| Figure 14 : Formation du biofilm en milieu complexe pour <i>P. aeruginosa</i> | 27 |
| Figure 15 : Formation du biofilm en milieu minimum pour <i>P. aeruginosa</i> | 28 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Formation du biofilm en milieu complexe pour <i>S. aureus</i> à différents pH et à différentes températures d'incubation. | 24 |
| Tableau 2: Formation du biofilm en milieu minimum pour <i>S. aureus</i> à différents pH et à différentes températures d'incubation. | 25 |
| Tableau 3: Formation du biofilm en milieu complexe pour <i>E. coli</i> à différents pH et à différentes températures d'incubation. | 26 |
| Tableau 4: Formation du biofilm en milieu minimum pour <i>E. coli</i> à différents pH et à différentes températures d'incubation. | 26 |
| Tableau 5: Formation du biofilm en milieu complexe pour <i>P. aeruginosa</i> à différents pH et à différentes températures d'incubation. | 27 |
| Tableau 6: Formation du biofilm en milieu minimum pour <i>P. aeruginosa</i> à différents pH et à différentes températures d'incubation. | 28 |

LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|----|
| Annexe 1 : <i>Staphylococcus aureus</i> | I |
| Annexe 2 : <i>Escherichia coli</i> | I |
| Annexe 3 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | I |
| Annexe 4: Cristal violet ou violet de Gentiane | II |
| Annexe 5: Quorum sensing (QS) | II |

INTRODUCTION

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires se reproduisant par division binaire. Elles sont classées en différents genres et chaque genre est constitué de différentes espèces. Selon les espèces, les bactéries se retrouvent sur un grand nombre d'habitats, comme le sol, la mer et surtout les êtres vivants. Cette propriété est sans doute due à leur très grande faculté d'adaptation qui leur permet de coloniser une grande variété d'environnement. Leur impact sur l'écosystème est considérable, et des différents chercheurs sont encore en train de découvrir les multiples influences qu'elles peuvent avoir. Bien qu'étant unicellulaires, les bactéries ont développé une capacité de vie sociale, communicative et unifiée, à l'image des organismes pluricellulaires. Les principales formes de vie sociale développées par les bactéries sont la vie en planctonique et la vie en biofilm. Ce dernier est défini par une communauté bactérienne adhérant à une surface naturelle ou synthétique et englué dans une matrice d'exopolymères [AYE, 2015].

Depuis plusieurs années, le biofilm est reconnu comme la forme de développement majoritaire des bactéries dans la nature. En effet, ce mode de développement confère aux bactéries de nombreuses protections vis-à-vis des différents stress environnementaux. Il se trouve que ce mode de croissance est souvent associé à des problèmes de santé publique, tels que la formation de biofilms contenant des bactéries opportunistes dans les réseaux d'eau, sur les dispositifs médicaux (cathéters, endoscopes...) ou encore la peau et les muqueuses du corps humain. Une fois le biofilm formé, il est très difficile de l'éliminer du fait de sa grande résistance aux agents antibactériens [COURNET, 2010]. A l'inverse, les biofilms peuvent être utiles, à l'exemple des biofilms bactériens et fongiques qui se développent sur les feuilles pour leur bonne décomposition [McNAMARA *et al.*, 2004]. De plus, les biofilms peuvent être exploités à des fins de traitement d'eaux usées à l'exemple du biofiltre de bioremédiation qui est constituée d'une communauté de différents microorganismes (bactéries, champignons, levures, etc.) [PURSWANI *et al.*; 2011] capable d'éliminer les résidus d'hydrocarbure.

Il est donc intéressant de connaître les conditions propices à la formation du biofilm soit afin de lutter contre son développement soit en vue de les favoriser selon les besoins.

Plusieurs microorganismes peuvent régénérer un biofilm, à l'exemple *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Pseudomonas*

aeruginosa (*P. aeruginosa*) sur lesquels nous avons porté l'ensemble de ce travail de mémoire.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la formation du biofilm chez *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* selon trois variables que sont la composition (minimum et complexe), l'acidité (pH 5 à 8) du milieu de culture et la température de croissance. Le premier volet de ce mémoire est une **étude bibliographique** qui fait la synthèse des connaissances développées sur les étapes de la formation du biofilm en particulier pour les trois bactéries d'intérêt. Le deuxième volet comporte les **matériels et méthodes** utilisées durant notre travail de laboratoire et le troisième volet présente les **résultats et commentaires**. Enfin, le quatrième et dernier volet montre nos **discussions et perspectives**.

***PARTIE I : SYNTHESE
BIBLIOGRAPHYQUE***

I. LE BIOFILM

I.1. Historique

D'après les recherches les plus récentes, les bactéries étaient apparues sur Terre il y a environ 3,6 milliards d'années; soit bien avant l'apparition de l'Homme lui-même, il y a environ 100 000 années. L'homme ne se doutait pas de l'existence même des microorganismes jusqu'au 17^{ème} siècle, lorsqu'Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) a développé le premier microscope [ALNNASOURI, 2010]. C'est aussi durant cette période qu'Antoni Van Leeuwenhoek a décrit pour la première fois les "biofilms" [IRIMES, 2010] après observation des communautés de microorganismes à la surface des dents avec son propre microscope primitif [ROCHEMONTEIX, 2009; OTHMANI, 2014; DJELLOUL2009]. En 1943, la première étude scientifique était consacrée aux biofilms [PAROT, 2007] et c'était William Costerton qui a proposé puis défendu et finalement popularisé la notion du biofilm [SQUINAZI, 2013]. Claude Zobell montra que dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont beaucoup plus nombreuses que celles en suspension [ROUX *et al.*, 2006]; et que des nutriments organiques de très faible quantité s'adsorbent et favorisent la formation de communautés bactériennes (biofilm) fixées sur les surfaces [DJELLOUL, 2009]. En 1970, l'étude des biofilms a pris véritablement son essor sous l'impulsion de Characklis puis de Costerton [ROCHEMONTEIX, 2009]. En 1973, Characklis démontre que les matrices d'exopolymères des biofilms sont résistantes contre l'action des désinfectants notamment ceux à base de chlore [ROCHEMONTEIX, 2009; DJELLOUL, 2009]. En 1978, John William Costerton a élaboré et a présenté la théorie des biofilms en suggérant que ce serait le mode de vie naturel de la plupart des microorganismes [BENDOUAH, 2008; IRIMES, 2010]. Les biofilms peuvent aussi se présenter sur des matériaux médicaux comme le cathéter comme l'a démontré Christensen *et al* (1982) qui ont été les premiers à observer la formation d'un biofilm chez une souche de *Staplylococcus epidermidis* isolée d'un cathéter. Par ailleurs, ils ont développé des procédés d'obtention de biofilm en tube plastique et en plaque de micro-titration qui sont devenus aujourd'hui des méthodes de références pour sélectionner des souches formant des biofilms [PLANCHON, 2006].

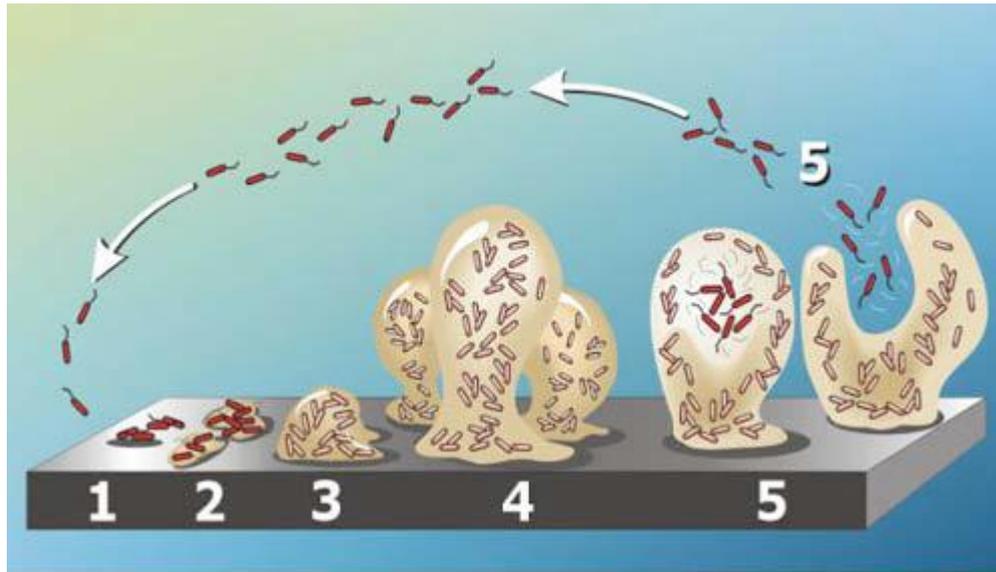
I.2. Définitions

La définition d'un biofilm a beaucoup évolué depuis sa découverte attribuée à Van Leeuwenhoek au 17^{ème} siècle. Le biofilm est une communauté de microorganismes, qui peut se composer d'une seule espèce de bactéries ou de champignons ou plus fréquemment de multiples espèces variées. Elles sont séparées par des espaces libres parcourues par des canaux aqueux et dépourvues de bactéries [ROUX *et al.*, 2006]. Le biofilm est une communauté de bactéries attachées entre elles de façon irréversible à une surface biotique ou abiotique par sécrétion d'une matrice protectrice et complexe de substances exopolymériques appelées EPS (ExoPolymeric Substances) [ALNNASOURI, 2010].

Les biofilms sont dits ubiquitaires du fait qu'ils concernent le monde animal, végétal, minéral, et aquatique avec des épaisseurs variables [DESPLACES, 2011]. Ils correspondent à un environnement physiquement structuré et hétérogène présentant des teneurs variables en oxygène ou en nutriments avec des valeurs de pH différentes [ROUX *et al.*, 2006].

I.3. Formation

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi. Généralement, il existe 5 étapes dont la première étape consiste à l'adhésion réversible des microorganismes sur la surface conditionnée, la deuxième étape est l'adhésion irréversible, le début de la formation des microcolonies en troisième étape, en quatrième étape la phase de maturation du biofilm. Et pour finir, la cinquième étape décrit la phase de dispersion des cellules.



Avec :

- 1 : Phase d'adhésion réversible
- 2 : Phase d'adhésion irréversible
- 3 : Phase de la formation de microcolonies
- 4 : Phase de maturation du biofilm
- 5 : Phase de dispersion des cellules

Figure 1 : Les étapes de la formation du biofilm

Source : Schéma d'après D.Davis, Binghamton University, USA

I.3.1. Adhésion réversible

L'adhésion réversible est un phénomène au cours duquel les cellules s'adhèrent à une surface [MADODA, 2014] avec une intervention des mécanismes comme le chimiotactisme et la mise en place d'appendices générateurs de mouvement tels que les flagelles [COURNET, 2010] et elle est facilitée par les adhésines qui sont des récepteurs membranaires [MADODA, 2014]. Ce phénomène d'adhésion microbienne aux surfaces est conditionné par un certain nombre de facteurs, y compris les espèces de bactérie, la composition de la surface des cellules, la disponibilité des éléments nutritifs,... [ALNNASOURI, 2010]. Au cours de cette adhésion, les bactéries établissent des interactions faibles avec la surface conditionnée telles que les forces de Van der Waals, les forces acide-base de Lewis et les forces électrostatiques [OTHMANI, 2014; MADODA, 2014; PLANCHON, 2006; AYE, 2015; PAROT, 2007]. De nombreux facteurs environnementaux comme le pH (Potentiel d'hydrogène), la température, l'osmolarité du milieu, la

viscosité et les charges ioniques vont également influencer sur cette étape [OTHMANI, 2014] qui ne dure que 4 à 10 heures selon les bactéries [BOUTALEB, 2007].

I.3.2. Adhésion irréversible

L'adsorption irréversible est une adhésion permanente des bactéries avec une augmentation des capacités d'ancrage et perte de motilité flagellaire [IRIMES, 2010]. Des interactions de plus fortes énergies sont mises en jeu durant cette phase qui sont les liaisons hydrogènes, les liaisons covalentes ou interactions hydrophobes fortes [OTHMANI, 2014; AYE, 2015; PAROT, 2007] grâce aux macromolécules de surface bactérienne: les polysaccharides, les protéines et les lipopolysaccharides [AYE, 2015]. Cette phase est plus lente que la phase d'adsorption réversible [BOUTALEB, 2007] avec production d'EPS (ExoPolymeric Substances) qui vont renforcer l'adhésion des bactéries, les protéger de l'action d'agents antimicrobiens et aussi faciliter le piégeage des éléments nutritifs indispensables pour leur croissance [OTHMANI, 2014].

I.3.3. Formation de micro-colonies

Une fois que l'attachement irréversible est établi, il y a agglutination puis croissance et multiplication des cellules qui vont pouvoir former des micro-colonies [AYE, 2015; ALNNASOURI, 2010; COURNET, 2010; YANNICK *et al.*, 2014] et vont recouvrir toute ou une partie de la surface conditionnée [PAROT, 2007]. Ces micro-colonies seront suivies par l'élaboration d'un biofilm plus ou moins complexe selon la composition en microorganismes du milieu, les conditions hydrodynamiques et chimique [OTHMANI, 2014].

I.3.4. Phase de maturation

Les micro-colonies vont converger pour constituer un biofilm plus ou moins complexe conduisant à un biofilm mature structuré [ARDRE, 2014], au sein duquel des canaux aqueux vont séparer les micro-colonies pour permettre l'élimination des déchets et la circulation des nutriments et des gaz [IRIMES, 2010; PAROT, 2007]. Le biofilm va atteindre une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur [PAROT, 2007], qui va permettre aux bactéries de synthétiser des exopolysaccharides et d'autres constituants de la matrice polymérique [YANNICK *et al.*, 2014].

I.3.5. Phase de dispersion

La phase de dispersion est dite phase planctonique parce que les microorganismes redeviennent libres de circulation. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles,...), les cellules du biofilm commencent à se détacher et vont migrer pour coloniser de nouvelles niches favorable à leur développement afin de pouvoir recommencer un nouveau cycle de vie [PAROT, 2007; ARDRE, 2014; YANNICK *et al.*, 2014; AYE, 2015].

I.4. Composition de la matrice du biofilm

Les bactéries se trouvant dans le biofilm sont liées par une matrice extracellulaire qui a comme rôles de protéger les bactéries de l'environnement extérieur et d'adhérer les biofilm à une surface [ARDRE, 2014]. La composition de la matrice du biofilm est très diversifiée. Cependant, comme elle est hautement hydratée, son composant majeur est l'eau parce qu'elle peut en contenir jusqu'à 97% d'eau [YANNICK *et al.*, 2014; CHARLEBOIS, 2015]. Les polysaccharides font partie aussi de sa fraction majeure car la majorité de ces composés sont de longues molécules linéaires ou branchées, possédant une masse entre $0,5 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^6$ Daltons [CHARLEBOIS, 2015]. Cette matrice peut être aussi constituée de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides, de cations et de la cellulose. ces derniers sont fréquemment retrouvés chez diverses espèces et genres de bactéries. Il faut mentionner que la composition de la matrice du biofilm varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance [YANNICK *et al.*, 2014].

I.5. Structure et architecture du biofilm

Un biofilm est dit homogène lorsqu'il est constitué d'une seule espèce de microorganismes, et il est hétérogène lorsqu'il est constitué de plusieurs espèces bactériennes. La plupart des biofilms rencontrés dans le temps et dans l'espace sont hétérogènes [ROCHEMONTEIX, 2009]. Des observations microscopiques et macroscopiques sont faites sur le biofilm. Du point de vue microscopique, les biofilms ont une architecture et organisation particulière car la couche que forment les biofilms est faite de protrusion en forme de champignon ou de "tige de haricot",

et du point de vue macroscopique, ils forment des rides caractéristiques de leur propriété viscoélastique [ARDRE, 2014].

I.6. Facteurs favorisant la formation du biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs, notamment les caractéristiques de la surface, les caractéristiques du milieu, et les propriétés des bactéries.

- Les caractéristiques de la surface : la rugosité, la texture, la présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface, la présence d'aspérités et d'hydrophobicités.
- Les caractéristiques du milieu : le pH, la température, la vitesse du flux, la présence d'un flux laminaire ou non, le fer, les nutriments, les cations (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Na^{2+} , ...), la source de carbone disponible, la disponibilité du milieu en oxygène et la présence d'agent antimicrobien.
- Les propriétés des bactéries : la production d'exopolysaccharides, la présence de fimbriae et des flagelles, et l'hydrophobicité de la surface de la bactérie.

De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardives sont possibles dans des conditions nutritives peu favorables. Ainsi, le type de biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms [ROCHEMONTEIX, 2009; GRASTEAU, 2011].

I.7. Résistance bactérienne à divers agents antimicrobiens liés au biofilm

Plusieurs études ont examiné les mécanismes de résistance des bactéries au biofilm aux divers agents antimicrobiens et des hypothèses ont été proposées. La majorité d'entre elles associent cette résistance à la présence de la matrice extracellulaire [MADODA, 2014]. Les propriétés viscoélastiques de cette dernière produite par les cellules du biofilm incitent tout naturellement à proposer que cette biomasse pourrait jouer un rôle de barrière à la diffusion des antibiotiques [OUBEKKA, 2012]. La résistance accrue du biofilm aux antibiotiques et désinfectants est liée aux conditions de vie dans le biofilm comme l'hétérogénéité, l'accès aux nutriments, oxygène... Cette résistance pourrait également reposer sur la présence d'une sub-population des bactéries résistantes, capable de résister à des fortes concentrations d'antibiotiques [ROUX *et al.*, 2006]. Pour la bactérie, le biofilm représente donc un moyen de subsister dans un environnement nocif.

I.8. Utilités du biofilm

Les biofilms peuvent se révéler très utiles dans plusieurs domaines, y compris le domaine agroalimentaire et industriel.

Concernant le domaine alimentaire, les biofilms sont utilisés dans la production du vinaigre et dans la production d'éthanol dans des réacteurs disposés verticalement, dans lesquels des levures *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisés sous forme de biofilm [MUATASEM, 2010].

Ils sont utilisés dans le domaine industriel par leurs propriétés de synthèse de certaines substances chimiques ou par leur propriété anticorrosion mais aussi pour le traitement biologique des eaux usées (autoépuration des lacs, système des boues activées dans certaines stations d'épuration) [ROCHEMONTEIX, 2009; MUATASEM, 2010]. Les biofilms sont aussi importants dans le traitement des déchets par un mécanisme de "bioremédiation".

A part ces avantages, les biofilms jouent aussi un rôle écologique capital, et contribuent au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes en participant au cycle de carbone et de l'eau [ROUX *et al.*, 2006]. Enfin, les biofilms peuvent jouer le rôle de véritables bio-indicateurs de pollution [ROCHEMONTEIX, 2009].

I.9. Conséquences néfastes du biofilm

A l'inverse des avantages que l'on peut tirer des biofilms, ils peuvent également causer des sérieux problèmes dans le secteur biomédical ainsi que le secteur agroalimentaire.

Sur le secteur biomédical, plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont liées à la présence de biofilm, et dans les pays développés, 65% des infections sont dues à des biofilms [GRASTEAU, 2011]. En milieu hospitalier, des équipements médicaux peuvent être le siège de la formation du biofilm qui, par conséquent sont l'origine d'infections nosocomiales souvent difficiles à éradiquer et représentant un problème majeur de santé publique [ROCHEMONTEIX, 2009].

Sur le secteur agroalimentaire, les biofilms peuvent coloniser les surfaces qui sont en contact avec les aliments et causer ainsi la contamination, la détérioration et l'altération des qualités organoleptiques des produits [MADODA, 2014].

I.10. Moyens de lutte contre les biofilms

Les biofilms posent de graves problèmes de santé publique. Il est important d'éradiquer les biofilms nuisibles. La lutte contre le biofilm peut se définir selon deux axes principaux: inhibition et élimination.

Il existe plusieurs moyens d'empêcher la formation du biofilm indésirable, comme l'inhibition ou le blocage de l'adhésion réversible ou irréversible, inhibition de la métamorphose du phénotype planctonique en phénotype biofilm [DELORME, 2012].

Une fois que les biofilms sont présents, le meilleur moyen de lutter contre ces biofilms est de les détruire. Cela peut s'effectuer en pratiquant l'antibiothérapie à long terme, en ciblant la matrice exopolysaccharide et les bactéries persistantes, et aussi en inhibant le mécanisme de "Quorum Sensing" [AUGER, 2012].

II. LES SOUCHES BACTERIENNES

II.1. *Staphylococcus aureus*

II.1.1. Généralités

En 1880, le chirurgien Sir Alexander Ogston a décrit pour la première fois les staphylocoques et a créé le genre *Staphylococcus*. C'est en 1884 que *S. aureus* a été nommé par le Docteur Rosenbach d'après la pigmentation dorée des colonies en culture pure obtenues d'isolat de lésions purulentes [BEAUDRY, 2011].

S. aureus est une coque à Gram positif de 0,8 à 1 µm de diamètre appartenant à la famille des Staphylococcaceae [LACHANCE, 2015]. En microscopie, il peut être isolé en paire ou en tétrade, mais le plus souvent il forme des amas ressemblant à des grappes (figure 2). *S. aureus* est une bactérie immobile, non sporulante et aéro-anaérobie facultative, possédant à la fois de la catalase et coagulase positive [BEAUDRY, 2011; BERNIER, 2015; KARA 2014]. La température optimale de croissance de *S. aureus* est comprise entre 30 et 37°C et le pH optimal est entre 7 et 7,5. *S. aureus* est résistant à la bacitracine et aux conditions diverses comme la concentration en NaCl, la chaleur, les désinfectants et la présence de lysozyme [BEAUDRY, 2011].

S. aureus est considéré comme une bactérie redoutable par son pouvoir pathogène et son habilité à déjouer le mode d'action de l'arsenal thérapeutique disponible [REBIAHI *et al.*, 2014]. Chez l'Humain, *S. aureus* colonise

principalement le nez mais peut aussi se trouver dans le système gastro-intestinal et les aisselles [BEAUDRY, 2011; BERNIER, 2015].

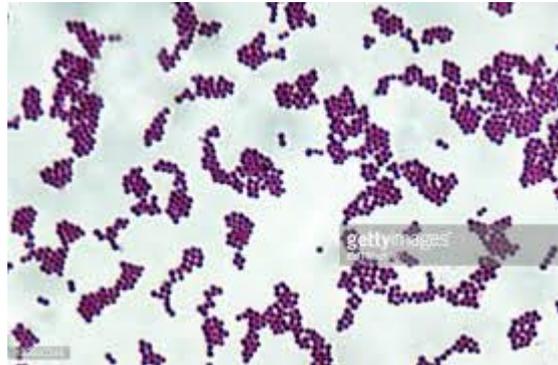


Figure 2 : *Staphylococcus aureus*

Source : www.futura-sciences.com

II.1.2. Biofilm de *Staphylococcus aureus*

Le processus de la formation de biofilm chez *S. aureus* se fait principalement en deux étapes: l'attachement initial et l'accumulation. Toutefois, ces deux étapes peuvent être génétiquement séparées.

La première étape consiste à l'attachement initial réversible puis irréversible des cellules à un support solide. Ce support solide peut être le tissu hôte (peau, épithélium,...) ou les matériaux utilisés dans le secteur agroalimentaire (surface de découpe, sols, murs,...) ou dans le secteur médical (cathéters, prothèses,...). Cette adhésion est régie par l'équilibre entre trois forces physico-chimiques fondamentales non spécifiques, à savoir les forces de Van der Waals, l'électrostatique et l'interaction acide/base [DJELLOUL, 2010; PLANCHON, 2012; KARA, 2014].

La deuxième étape concerne l'accumulation des bactéries qui conduit à la formation des microcolonies. Cette étape inclut la division cellulaire ainsi que la production d'exopolysaccharide et conduit à la formation d'un biofilm mature. Elle est caractérisée par l'agrégation intercellulaire, et parmi les facteurs responsables de cette agrégation figurent des composés de surfaces tels que le PIA (Adhésine Intercellulaire Polysaccharidique) et le BAF (Biofilm Associated Protein). Le vieillissement d'un biofilm est parfois suivi d'une phase de détachement qui permet aux bactéries de coloniser d'autres sites. Chez *S. aureus*, la viscoélasticité des biofilms qu'il forme lui permet de résister au détachement causé par un flux environnant ou des stress mécaniques. De plus, cette viscoélasticité entraîne un

phénomène de "rolling" chez les micro-colonies qui leur permet de migrer vers des nouvelles niches [PLANCHON, 2012].

La formation de biofilm est un processus dynamique dans lequel les facteurs impliqués dans l'adhésion initiale sont différents de ceux qui favorisent l'accumulation et donc la persistance bactérienne.

II.2. *Escherichia coli*

II.2.1. Généralités

En 1885, Theodor Escherich a découvert dans des selles de nourrissons une souche qu'il dénomma *Bacterium coli commune* qui aujourd'hui est connue sous le nom d'*Escherichia coli* [RAMOS, 2010; www.safewater.org]. *E. coli* est une bactérie qui se trouve couramment dans le tractus gastro-intestinal des humains et commensal du microbiote intestinal des mammifères [NASSOUR, 2014].

E. coli est un bacille à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Elle est mobile avec ciliature péritriche, non sporulant et non encapsulée et peut grandir en présence ou absence d'oxygène car il s'agit d'une bactérie aéro-anaérobie facultative (figure 3). Elle pousse facilement sur des milieux de culture ordinaires, et possède une oxydase négative [LAVIGNE]. Il existe plusieurs variétés d'antigène chez *E. coli*: antigène O (somatique), Antigène H (flagelle), Antigène K (capsule) [SECK, 2005].

E. coli est la bactérie la mieux connue et la plus étudiée de nos jours, car elle est utilisée en tant que marqueur de la qualité de l'eau et des sédiments; mais elle peut être aussi un redoutable pathogène pouvant provoquer des maladies sévères [RAMOS, 2010].

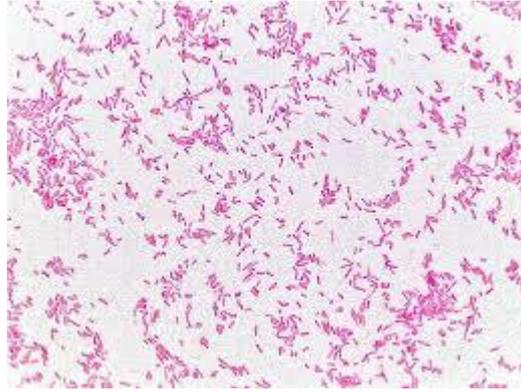


Figure 3 : *Escherichia coli*

Source : www.bacteriainphotos.com

II.2.2. Biofilm d'*Escherichia coli*

Parmi les facteurs de virulence décrits chez *E. coli*, un certain nombre sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation du biofilm. On peut citer les flagelles et les fimbriae (ou pili), plutôt impliqués dans les étapes d'adhérence aux surfaces et de développement précoce du biofilm, ainsi que l'antigène 43 (Ag43), le PGA (Poly-b-1,6-N-acétyl-glucosamine), la cellulose ou l'acide colanique qui ont un rôle dans la maturation du biofilm. Une étude a montré le rôle décisif des flagelles dans l'initiation de la formation de biofilm: ils favoriseraient l'attachement initial des bactéries à une surface en luttant contre les forces électrostatiques répulsives et leur permettraient de se propager le long de cette surface. Cependant, certaines souches non mobiles sont également capables de produire du biofilm. Il s'agit du cas des *E. coli* entéroagrégatifs ou de souches surexprimant des adhésines de surfaces telles que les curli.

Les curli faciliteraient l'attachement initial des surfaces inertes. Ils permettent aux bactéries de s'agréger entre elles et de former des amas: cette propriété est utilisée dans l'étape initiale de développement du biofilm.

L'Ag43 est une protéine de surface qui permet l'agrégation des bactéries entre elles et donc la formation des microcolonies. Il aurait un rôle dans le développement tridimensionnel des biofilms.

En parallèle avec l'expression des protéines adhésives, la production d'une matrice est essentielle pour la maturation du biofilm. Les interactions entre les différents constituants de la matrice peuvent participer à la croissance tridimensionnelle du biofilm. L'implication du PGA dans la formation des biofilms a été découverte récemment chez *E. coli*. Le PGA est un polymère polysaccharidique

impliqué dans l'attachement aux surfaces, dans l'adhérence entre les bactéries et dans la structuration du biofilm. Une étude sur la dipolymérisation du PGA par un traitement spécifique a conduit à un déséquilibre complet et à une dispersion du biofilm [AUGER, 2012].

II.3. *Pseudomonas aeruginosa*

II.3.1. Généralités

Pour la première fois en 1882, *Pseudomonas aeruginosa* a été décrit par Carle Gessard sous le nom de "*Bacillus pyocyaneus*" ou "bacille pyocyanique" [SALACHA, 2010; CHAKER, 2012]. *Pseudomonas* vient de deux mots grecs "*pseudo*" qui signifie "imitation" et "*mona*" qui veut dire "unité" [SALACHA, 2010]; et *aeruginosa* vient du mot latin "*aeruginosus*" [HAFIANE, 2007] qui signifie "vert-de-gris" et se réfère aux pigments que secrète la bactérie [SALACHA, 2010].

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif [FAURE *et al.*, 2007] appartenant à la famille de Pseudomonadaceae [PECASTAINGS, 2010]. Il est mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire, non sporulé, avec une longueur comprise entre 1 à 5µm et une largeur entre 0,5 et 1µm (figure 4) [CHAKER, 2012; SQUINAZI, 2013]. *P. aeruginosa* est une bactérie possédant un métabolisme oxydatif [MEZAACHE, 2012], aérobie stricte, mésophile capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C mais sa température optimale de croissance se situe entre 30°C et 37°C. Il est ubiquitaire et saprophyte de l'eau, des végétaux et des matières en décomposition [MERENS, 2008; SALACHA, 2010; YETERIAN, 2010; BOUKHATEM, 2013]. *P. aeruginosa* produit des exopolysaccharides, tels que l'alginate qui est une substance muqueuse [FILLOUX *et al.*, 2003] et nécessaire à la formation, à l'architecture et à la structuration du biofilm [RASAMIRAVAKA, 2014].

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste [RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015] puisqu'il est responsable de sévères infections chez les personnes immunodéprimées, les gens souffrant de fibrose kystique [FAILLE, 2010 ; RUIMY, 2004], les patients souffrant de maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) [BILODEAU, 2015].



Figure 4 : *Pseudomonas aeruginosa*

Sorce : www.textbookofbacteriology.net

II.3.2. Biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*

La formation du biofilm communément admis chez *P. aeruginosa* comporte cinq étapes: l'adhésion réversible, l'adhésion irréversible, la formation des micro-colonies, la maturation du biofilm et la dispersion.

Dans l'adhésion réversible, une interaction de la bactérie avec le support aura lieu. La bactérie pourrait être éloignée du support s'il existe une simple agitation ou une modification de sa composition ou une modification de la température. Des différents types de forces s'exercent entre la surface du support et la bactérie elle-même: les forces d'attraction de Van der Waals, les forces électrostatiques [KHALILZADEH, 2009; COURNET, 2010; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2014], les interactions hydrophobes et stériques [KHALILZADEH, 2009; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2014]. La faible énergie de ces liaisons explique la notion de «réversibilité» par simples mouvements browniens des cellules bactériennes. Lorsque les paramètres environnementaux qui déclenchent le passage de la croissance planctonique à la vie sur une surface sont réunis, le processus de formation du biofilm est initié. Ainsi, *P. aeruginosa* est capable de former des biofilms dans la plupart des conditions qui permettent la croissance [RASAMIRAVAKA *et al.*, 2014].

Quand la bactérie se rapproche du support, d'autres types d'interactions vont être mises en place conduisant à une adhésion irréversible de la bactérie. La notion "irréversibilité" est liée aux multiples points d'interaction créés à cette étape, aboutissant à une liaison de forte énergie. L'adhésion irréversible des bactéries implique que les microorganismes immobilisés soient vivants, capables de reconnaître leur position proche d'une surface. Flagelle, pili et LPS constituent des

éléments clés dans la mise en place de la phase d'adhésion irréversible de *P.aeruginosa* aux cellules épithéliales, et parmi ces structures, les exopolymères nouvellement synthétisés par la bactérie jouent aussi un rôle important [KHALILZADEH, 2009; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2014].

L'adhésion irréversible va conduire à la présence de cellules isolées, voire d'agrégats, à la surface du matériau ou de la muqueuse qui se suit d'une division cellulaire et d'une augmentation en volume, d'où la formation de micro-colonies. Au cours de cette étape, la quantité, la nature, les propriétés d'EPS varient en fonction des conditions environnementales. EPS et alginate jouent un rôle important dans la structuration du biofilm de *P. aeruginosa*. Cependant, la présence d'alginate ne serait pas cruciale pour le développement d'un biofilm par *P. aeruginosa* [KHALILZADEH, 2009].

Dans la phase de maturation, le biofilm va acquérir une structure tridimensionnelle au bout de 24h ; et c'est lors de cette étape qu'il va prendre la forme de «champignon», caractéristique chez *P. aeruginosa* [KHALILZADEH, 2009; COURNET, 2010; RASAMIRAVAKA, 2014]. Au sein d'un biofilm mature, il existe des différents phénotypes de *P. aeruginosa*. Dans la partie la plus externe du biofilm, les *P. aeruginosa* sont métaboliquement très actifs et dans la partie en profondeur, les *P. aeruginosa* sont métaboliquement peu actifs [RASAMIRAVAKA, 2014].

Enfin, la dispersion du biofilm est un phénomène complexe et peu exploré chez *P. aeruginosa*. Dans cette phase, la production de phosphodiesterase DipA et de biosurfactants (rhamnolipides) par *P. aeruginosa* pourraient favoriser la dispersion des cellules de la matrice du biofilm [GRASTEAU, 2011]. Les auteurs ont observé que, dans un biofilm constitué de l'espèce *P. aeruginosa*, la mort d'un grand nombre de cellules intervient régulièrement mais ceux qui sont résistantes peuvent retourner à l'état de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces ou fluides.

***PARTIE II : MATERIELS ET
METHODES***

I. LES MATERIELS UTILISES

I.1. Souches bactériennes

Trois souches bactériennes ont été utilisées pour la réalisation de ce travail. Il s'agit des souches de références ATCC (American Type Culture Collection) : *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 et *P. Aeruginosa* ATCC 27853.

I.1.1. Conservation

Pour bien conserver les souches, elles sont mises dans le réfrigérateur à 4°C et régénérer avant chaque test biologique.

I.2. Milieux de culture

Deux types de milieux sont utilisés dans ce travail. Il s'agit du milieu complexe (plusieurs sources de carbone) et du milieu minimum (une seule source de carbone).

I.3. Matériels et équipements de laboratoire

Les matériels de laboratoire utilisés sont tous stérilisés pour éviter les différentes contaminations qui pourraient nuire à l'interprétation des résultats durant la manipulation. Les matériels et équipements de laboratoire sont divisés en 3 grands groupes:

- Les verreries: éprouvettes graduées (250mL), Erlen Meyer (500 mL et 1000 mL), flacons (250 mL), pipettes graduées (5 mL)
- Les petits matériels: balance de précision, pH mètre, ultrason, bec Bunsen, spatule, micropipette, contrôle pipette, plaques à 96 puits, portoir, papier aluminium
- Les gros matériels: autoclave, étuves d'incubation (25°C et 37°C), hôte à flux laminaire verticale

II. METHODES

II.1. Préparation du milieu de culture

Toutes les manipulations ont été effectuées dans la zone aseptique de travail pour éviter tous types de contamination.

II.1.1. Milieu complexe

Le milieu complexe préparé est le milieu liquide Luria Bertani-MOPS (LB-MOPS)

a. Réactifs utilisés (compositions du milieu)

| | |
|-----------------|--------------|
| - LB | 25g |
| - MOPS 50mM | 10g |
| - Eau distillée | 1L |
| - KOH 1N | à la demande |
| - HCl 0,2N | à la demande |

b. Mode opératoire

Tout d'abord, 300 mL d'eau distillée ont été versés dans un Erlen Meyer à l'aide d'une éprouvette graduée. Après, 25g de poudre de bouillon LB ont été pesés et versés dans l'Erlen Meyer contenant le 300 mL d'eau distillée; et c'est après que le reste d'eau distillée a été versé. Suivi de 10g de poudre de MOPS 50mM qui a été pesé à l'aide d'une balance de précision et le tout est remué par une spatule. Puis, la solution qui a été préparé est mise sous ultrason en bouchant l'Erlen Meyer avec du papier aluminium pendant quelques minutes pour bien homogénéiser les particules solides de bouillon LB et MOPS 50mM avec les molécules d'eau.

Ensuite, 4 flacons ont été préparés afin de pouvoir diviser le milieu, donc 200 mL de ce milieu ont été versés dans chaque flacon. Le pH de chaque milieu contenu dans chaque flacon a été ajusté en ajoutant du KOH ou du HCl en fonction du pH recherché.

Enfin, les 4 flacons ont été mis à stériliser sous autoclave en desserrant les bouchant pendant 1 heure.

II.1.2. Milieu minimum

a. Réactifs utilisés (compositions du milieu)

| | |
|---|-----------------------------|
| - Eau distillée | 1L |
| - MgSO ₄ , 2H ₂ O | 0,3g/L |
| - FeSO ₄ , 7H ₂ O | 0,0005g/L (1grain) |
| - Na ₂ HPO ₄ anhydre | en fonction du pH recherché |
| - KH ₂ PO ₄ | 0,5g/L |
| - (NH ₄) ₂ SO ₄ | en fonction du pH recherché |
| - Glucose | 0,05g/L |

b. Mode opératoire

Tout d'abord, 1000 mL d'eau distillée ont été préparées à l'aide d'une éprouvette graduée et le tout a été versé dans un Erlen Meyer. Après, 0,3g de MgSO₄; 1 grain de FeSO₄; 0,5g de KH₂PO₄, 0,1g de (NH₄)₂SO₄ et 0,05g de glucose ont été pesés et versés dans l'Erlen Meyer contenant le 1000ml d'eau distillée. L'Erlen Meyer a été mis sous ultrason pour que le milieu soit bien homogénéiser avant de mesurer son pH du départ à l'aide d'un pH mètre qui est égal à 6,27. Le milieu a été réparti en 4 quantités égales de 250 mL dans des flacons de 500 mL étiquetés pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8. Le pH de chaque flacon est ajusté comme suit :

Pour obtenir le pH 5 : il faut peser 0,010g de Na₂HPO₄ et 0,050g de (NH₄)₂SO₄ et les versés dans le milieu étiqueté pH5 (250 mL) ;

Pour obtenir le pH6 : il faut peser 0,150g de Na₂HPO₄ et 0,025g de (NH₄)₂SO₄ et les versés dans le milieu étiqueté pH6 (250 mL) ;

Pour obtenir le pH7 : il faut peser 0,3125g de Na₂HPO₄ et le versé dans le milieu étiqueté pH7 (250 mL) ;

Pour obtenir le pH8 : il faut peser 0,950g de Na₂HPO₄ et le versé dans le milieu étiqueté pH8 (250 mL).

II.2. Préparation de la suspension bactérienne

II.2.1. Modes opératoires

a. Régénération des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont régénérées dans un tube de 14 mL contenant un milieu complexe pH 7 et incubé à 37°C pendant 24 heures. Les souches régénérées sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose Columbia

afin d'avoir des colonies isolées pour la préparation des suspensions bactériennes mères. Ces dernières sont préparées à partir de 1 mL de milieu complexe à pH 7 dans laquelle trois colonies bien isolées de la souche à étudier ont été ajoutées.

b. Milieu complexe

Dans le cadre de ce travail, sachant que trois espèces de bactéries sont utilisées avec quatre pH différents (pH 5, pH 6, pH 7, et pH8), 12 tubes de 14 mL ont été utilisés pour chaque condition. Ces tubes ont été bien étiquetés pour ne pas les confondre lors de la manipulation; à chaque tube une bactérie et un pH bien défini. Les 4 flacons (250 mL) préparés auparavant contenant les milieux complexes sont alors utilisés pour la préparation de la suspension bactérienne. Après 5,8 mL du milieu ont été prélevés à l'aide d'une pipette graduée et versés dans chaque tube de 14 mL correspondant à l'étiquette. Puis 200 µL de la suspension mère de *S. aureus* ont été prélevés et aussi versés dans chaque tube correspondant à *S. aureus* contenant le 5,8 mL de milieu pour avoir une suspension totale de 6 mL. La même procédure a été appliquée pour les autres bactéries (*E. coli* et *P. aeruginosa*).

c. Milieu minimum

La même procédure que pour le milieu complexe a été adoptée mise à part la proportion entre milieu minimum et suspensions bactériennes régénérées qui est de 1/5. Ainsi, 12 tubes de 14 mL ont été aussi préparés et étiquetés comme dans la préparation de la suspension mère en milieu complexe. Ensuite, 4,8 mL du milieu ont été versés dans chaque tube correspondant au pH, puis 1,2 mL de la suspension mère de *S. aureus* ont été versés dans chaque tube correspondant à l'étiquette de *S. aureus*. La même procédure a été adoptée pour préparer *E. coli* et *P. aeruginosa*. Au final, un tube de 14 mL contient 6 ml de suspension bactérienne.

II.3. Culture sur plaques de 96 puits

II.3.1. Principe

Les biofilms sont typiquement étudiés dans un environnement statique sur plaque de 96 puits. La culture de chaque bactérie est réalisée dans chaque puits afin de pouvoir observer la formation du biofilm. Ce système possède l'avantage d'être simple à réaliser et permettant le criblage à haut débit et de petits volumes. Cependant, les microplaques sont des systèmes fermés et il y a une absence de force

de cisaillement, le différenciant du système en flux continu qui se rapproche plus des conditions réelles.

II.3.2. Modes opératoires

Pour le développement du biofilm, 200 μ L de chaque suspension bactérienne sont inoculés dans la plaque à 96 puits. La plaque contenant du milieu complexe ou milieu minimum est incubée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures et une autre plaque incubée à 25°C pendant 48 heures. Après incubation, le bouillon et les bactéries planctoniques sont délicatement retirés à la micropipette. Chaque puits est rincé délicatement avec 300 μ L d'eau distillée afin de ne pas abimer le biofilm. Il ne faut pas laisser l'eau distillée trop longtemps afin de ne pas dissoudre le biofilm. Pour évaluer la formation du biofilm, les bactéries attachées ont été fixées avec 200 μ L de méthanol par puits, et après 15 minutes les plaques sont vidées et laissées à sécher. Les plaques ont été colorées avec 250 μ L du Cristal Violet (CV) ou Violet de Gentiane par puits pendant 15 minutes. Ensuite, le CV dans chaque puits a été enlevé et l'excès de colorant est ensuite rincé dans une bassine d'eau ou lavé délicatement à l'eau courante suivie d'un séchage des plaques à l'air.

Après séchage de la plaque, la lecture des résultats s'est faite selon une appréciation visuelle. Les résultats sont représentés et interprétés comme suit :

- Absence de biofilm: -

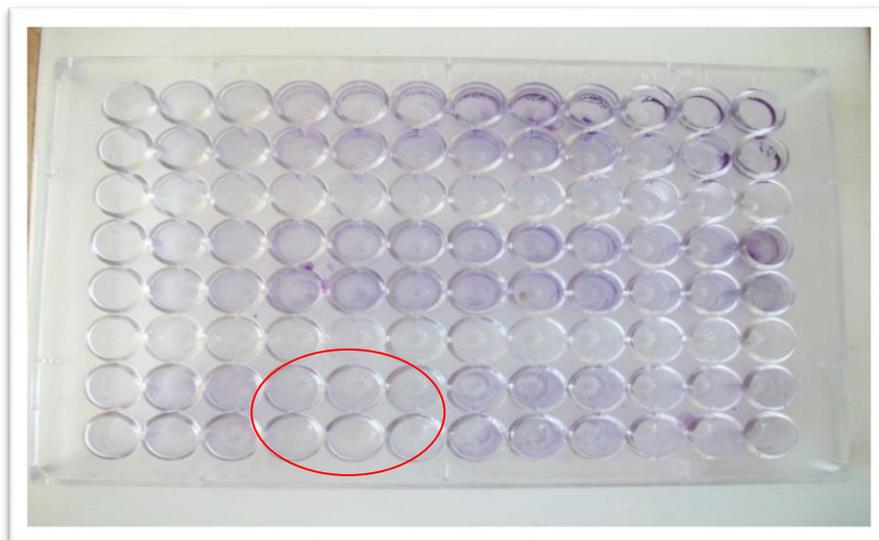


Figure 5 : Absence du biofilm

- Présence de biofilm à peine visible: + (ou 1+)

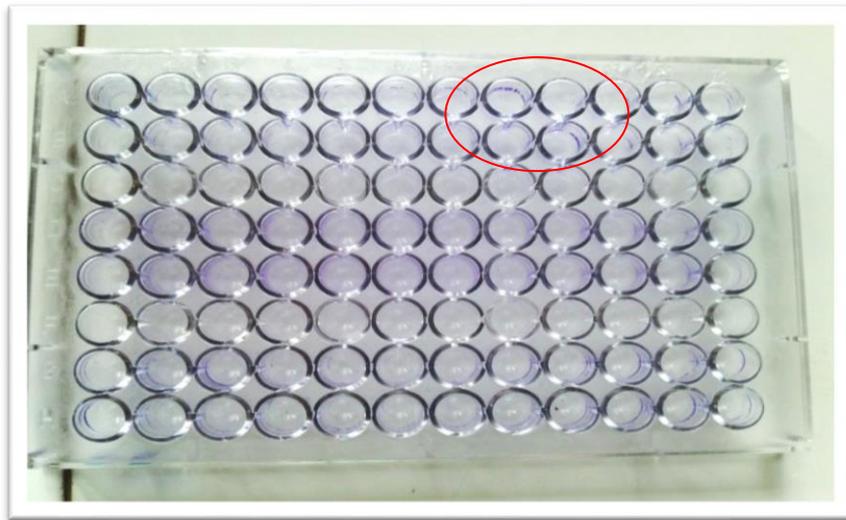


Figure 6 : Biofilm à peine visible dans chaque puits

- Présence de biofilm de façon discontinue sur la paroi ou le fond du puits : ++ (ou 2+)



Figure 7 : Biofilm formé sur la paroi de la plaque

- Présence de biofilm de façon continue sur la paroi et le fond du puits : +++ (ou 3+)



Figure 8 : Biofilm formé sur la paroi et le fond du tube

- Présence de biofilm sur toute la surface du puits : ++++ (ou 4+)



Figure 9 : Biofilm formé sur toute la surface du puits

Pour chaque condition, 6 répétitions techniques (c'est-à-dire 6 puits) ont été réalisés avec 3 répétitions biologiques (c'est-à-dire 3 tests différents).

***PARTIE III : RESULTATS ET
INTERPRETATIONS***

I. FORMATION DU BIOFILM PAR *Staphylococcus aureus*

I.1. En milieu complexe

Les résultats de la formation du biofilm par *S. aureus* à différent pH sont représentés dans le tableau n°1.

Tableau 1: Formation du biofilm en milieu complexe pour *S. aureus* à différents pH et à différentes températures d'incubation.

| | T° d'incubation | pH5 | pH6 | pH7 | pH8 |
|------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| <i>S. aureus</i> | 37°C | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ |
| | 25°C | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ |

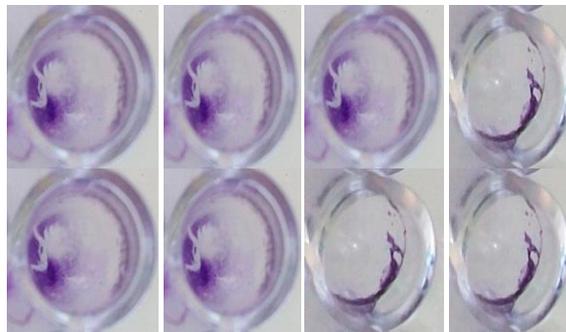


Figure 10 : Formation du biofilm en milieu complexe pour *S. aureus*

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, il y a formation étendue du biofilm sur la paroi et fond du puits à pH5, pH6 et pH7. A pH8, il y a aussi formation du biofilm mais en discontinu sur la paroi ou au fond du puits.

Après 48 heures d'incubation à 25°C, il y a présence du biofilm continu sur la paroi et au fond du puits à pH5 et pH6 tandis qu'à pH7 et pH8, le biofilm est présent en discontinue sur la paroi ou au fond du puits.

I.2. En milieu minimum

En milieu minimum, le même protocole que dans le milieu complexe a été adopté, mais avec des résultats sensiblement différents qui sont illustrés dans le tableau n°2.

Tableau 2: Formation du biofilm en milieu minimum pour *S. aureus* à différents pH et à différentes températures d'incubation.

| | T° d'incubation | pH5 | pH6 | pH7 | pH8 |
|------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| <i>S. aureus</i> | 37°C | 2+ | 3+ | 2+ | 3+ |
| | 25°C | 3+ | 3+ | 2+ | 3+ |

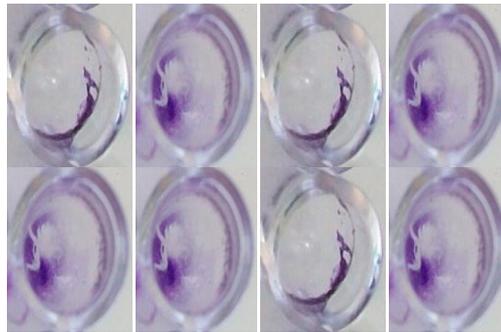


Figure 11 : Formation du biofilm en milieu minimum pour *S. aureus*

Après incubation à 37°C, il y a présence du biofilm de façon discontinue sur la paroi ou au fond du puits et cela se présente à pH5 et pH7. A pH6 et pH8, il y a formation du biofilm continu sur la paroi et au fond du puits.

A 25°C, le biofilm est bien présent sur la paroi et au fond du puits à pH5, pH6 et pH8. A pH 7, le biofilm se forme de façon discontinue sur la paroi ou au fond du puits.

Ainsi la température d'incubation et la variation du pH ont peu d'influence sur la formation du biofilm chez *S. aureus*. En effet, le biofilm se développe dans n'importe quelle condition avec juste quelque variation d'étendue minime.

II FORMATION DU BIOFILM PAR *Escherichia. coli*

II.1. En milieu complexe

Pour *E. coli*, la formation du biofilm en milieu complexe est représentée dans le tableau n°3.

Tableau 3: Formation du biofilm en milieu complexe pour *E. coli* à différents pH et à différentes températures d'incubation.

| <i>E. coli</i> | T° d'incubation | pH5 | pH6 | pH7 | pH8 |
|----------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| | 37°C | 1+ | 3+ | 3+ | 3+ |
| | 25°C | 2+ | 3+ | 3+ | 3+ |

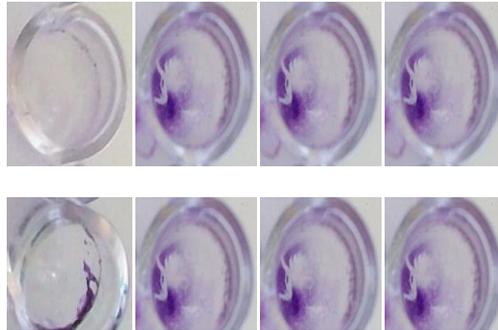


Figure 12 : Formation du biofilm en milieu complexe pour *E. coli*

Après incubation à 37°C et 25°C, la formation du biofilm pour *E. coli* est identique à pH6, pH7 et pH8 dans lesquelles le biofilm est visible de façon continue sur la paroi et au fond du puits. Dans un milieu complexe à pH5 et incubé à 37°C, le biofilm est à peine visible sur la paroi du puits tandis qu'à 25°C il est visible de façon discontinue sur la paroi ou au fond du puits.

II.2. En milieu minimum

Le tableau n°4 présente les résultats du biofilm par *E. coli* en milieu minimum.

Tableau 4: Formation du biofilm en milieu minimum pour *E. coli* à différents pH et à différentes températures d'incubation.

| <i>E. coli</i> | T° d'incubation | pH5 | pH6 | pH7 | pH8 |
|----------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| | 37°C | 2+ | 2+ | 1+ | 1+ |
| | 25°C | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ |

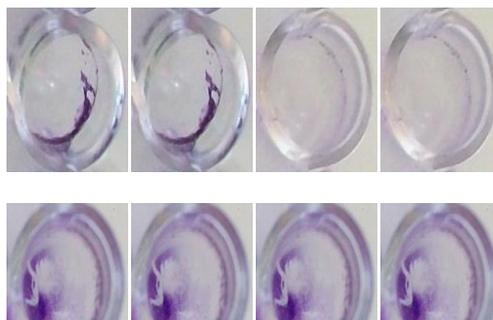


Figure 13 : Formation du biofilm en milieu minimum pour *E. coli*

Avec une température d'incubation à 37°C à pH5 et pH6, le biofilm d'*E. coli* se forme sur la paroi ou au fond du puits ; et pour pH7 et pH8 le biofilm à peine visible sur la paroi du puits.

Le biofilm est présent en continu sur la paroi et au fond du puits voire sur toute la surface du puits pour les 4 différents pH incubé à 25°C. Ainsi, la formation de biofilm chez *E. coli* est influencée par les conditions de culture. Un pH acide à 5 semble peu favorable à la formation du biofilm dans un milieu complexe à 37°C et à 25°C d'incubation. Dans un milieu minimum, le biofilm se forme moins bien à 37°C et surtout à pH alcalin.

III. FORMATION DU BIOFILM PAR *Pseudomonas. aeruginosa*

III.1. En milieu complexe

La formation du biofilm par *P. aeruginosa* est illustrée dans le tableau n°5.

Tableau 5: Formation du biofilm en milieu complexe pour *P. aeruginosa* à différents pH et à différentes températures d'incubation.

| | T° d'incubation | pH5 | pH6 | pH7 | pH8 |
|----------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| <i>P. aeruginosa</i> | 37°C | 0 | 0 | 3+ | 1+ |
| | 25°C | 0 | 2+ | 3+ | 2+ |



Figure 14 : Formation du biofilm en milieu complexe pour *P. aeruginosa*

Après une incubation à 37°C et à pH7 le biofilm est continu sur la paroi et au fond du puits, et à pH8 le biofilm est à peine visible sur la paroi.

A 25°C, l'absence du biofilm est marquée en pH5 mais aussi en 37°C à pH 5 et pH6. A pH6 et pH8, le biofilm se trouve sur la paroi ou au fond du puits tandis qu'à pH7, le biofilm est continu sur la paroi et au fond du puits.

III.2. En milieu minimum

Pour le milieu minimum, les résultats de la formation du biofilm sont représentés dans le tableau n°6.

Tableau 6: Formation du biofilm en milieu minimum pour *P. aeruginosa* à différents pH et à différentes températures d'incubation.

| | T° d'incubation | pH5 | pH6 | pH7 | pH8 |
|----------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| <i>P. aeruginosa</i> | 37°C | 1+ | 1+ | 2+ | 2+ |
| | 25°C | 2+ | 2+ | 3+ | 2+ |

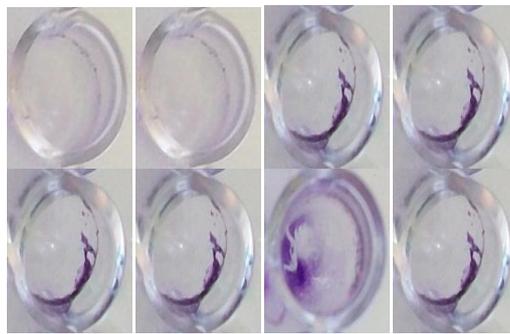


Figure 15 : Formation du biofilm en milieu minimum pour *P. aeruginosa*

Pour le pH5 et pH6 à 37°C, le biofilm est à peine visible sur la paroi du puits ; pour le pH7 et pH8 il se forme sur la paroi ou au fond du puits.

A 25°C, le biofilm est présent de façon discontinue sur la paroi ou au fond du puits à pH5, pH6 et pH8 tandis qu'à pH7 il est présent en continu sur toute la surface du puits.

Ainsi, le pH7 semble être le pH optimum quelque soit le milieu de culture ou la température d'incubation pour la formation du biofilm chez *P. aeruginosa* tandis que les conditions de pH acide (pH5 et 6) réduisent considérablement la formation du biofilm.

DISCUSSION

Pour *S. aureus*, la variation du pH n'a pas beaucoup d'influence sur la formation du biofilm si on considère la température d'incubation à 37°C. Les résultats de la formation du biofilm en milieu complexe sont presque équivalents de ceux en milieu minimum. La variation du pH et la température d'incubation n'ont pas d'effet négatif sur la formation du biofilm. Globalement, le biofilm chez *S. aureus* se développe peu importe les conditions de culture.

Pour *E. coli* le milieu de culture le plus favorable à former du biofilm est le milieu complexe peu importe la température d'incubation et le pH. A pH5, la formation du biofilm est minime par rapport aux autres pH et en milieu minimum, le biofilm d'*E. coli* se développe bien à une température égale à 25°C à tous les pH évalués.

Pour *P. aeruginosa*, la formation du biofilm est influencée par les différentes conditions de cultures car les résultats sont tous différents. A 37°C et à pH5 et pH6 *P. aeruginosa* ne forme pas de biofilm, ce qui explique qu'à pH acide le développement du biofilm chez *P. aeruginosa* est très affectée quel qu'en soit la température d'incubation. Par contre, quelque soit la température et quel qu'en soit le milieu, *P. aeruginosa* forme un biofilm presque complet à pH7, ce pH est donc très propice à la formation du biofilm tandis qu'à pH8 il y a formation du biofilm de quantité moindre. De même en milieu minimum à 37°C et à pH acide, la formation du biofilm par *P. aeruginosa* est négligeable car le biofilm est à peine visible. On peut constater aussi qu'en milieu minimum et à température égale, la formation du biofilm par *S. aureus* est supérieure à celle de *P. aeruginosa* à pH8.

Pour les trois bactéries étudiées, ce sont les mêmes forces (forces d'attraction de Van der Waals et les forces électrostatiques) qui interviennent dans la phase d'adhésion des bactéries [PLANCHON, 2012]. Toutefois, différents composés les différencie dans chaque phase de la formation du biofilm. Pour *S. aureus*, l'accumulation des bactéries est caractérisée par des composés de surfaces qui sont PIA et BAF. *S. aureus* qui est une coque à Gram positif, immobile, non sporulé et aéro-anaérobie facultatif, développe son biofilm en deux étapes qui peuvent être génétiquement séparées [KARA, 2014]. La simplicité de son processus de formation du biofilm expliquerait peut-être le fait que *S. aureus* forme aussi bien un biofilm en milieu complexe qu'en milieu minimum et quel que soit la température et l'acidité du milieu. A l'inverse, la formation du biofilm pour *E. coli* et *P. aeruginosa* qui sont des bacilles à Gram négatif, mobiles et non sporulant est affecté par l'acidité du milieu et

la température probablement en rapport avec la complexité du processus de formation de leur biofilm qui fait intervenir plusieurs facteurs et acteurs tels que la motilité (notamment les flagelles), les biosurfactants et le mécanisme de quorum sensing [RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015]. Le niveau d'acidité du milieu affecte probablement ces facteurs qui à leur tour perturbe le déroulement normal de la formation du biofilm.

De façon générale, pour bien apprécier la structure du biofilm formé, il faudrait une observation en microscopie optique en fluorescence et confocale, voire même en microscopie électronique. Par ailleurs, une analyse spectrophotométrique de la densité optique du cristal violet déposée dans chaque puits rendrait plus objective la quantification du biofilm formé. Il serait alors intéressant de classer les souches en trois catégories (peu productrice de biofilm, modérément productrice de biofilm et fortement productrice de biofilm) selon leur degré de formation du biofilm en utilisant la formule de l'indice de formation du biofilm spécifique (SBF) après avoir quantifié la DO de chaque bactérie [AUGER, 2012].

Une répétition de test pour chaque espèce bactérienne est intéressante pour obtenir des résultats fiables. La formation du biofilm pourrait être testée en modifiant l'atmosphère d'incubation en anaérobiose des plaques à 96 puits, et il serait intéressant de pouvoir réaliser des variations plus fines de la concentration d'O₂. Il aurait été intéressant de modifier le milieu de culture avec un supplément de 1% et 0,5% de glucose ou de tester la formation du biofilm dans un milieu pauvre en nutriment, car la formation du biofilm peut varier considérablement d'un milieu de culture à l'autre. Le taux de formation du biofilm serait peut-être plus élevé dans les milieux pauvres en nutriments que dans les milieux riches. Dans les milieux pauvres en nutriments les bactéries vont s'associer pour qu'elles puissent concentrer les nutriments présents d'où l'augmentation du taux de formation du biofilm.

Une étude de mécanisme de mobilité des souches est importante car elle influencerait la production du biofilm. D'ailleurs, cette mobilité est considérée comme un facteur impliqué dans la capacité des souches à former des biofilms. En prenant un exemple, parmi les souches peu productrices de biofilm, certaines sont très mobiles et d'autres non.

Enfin, pour les trois souches une étude des gènes de régulation aurait été intéressante.

***CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES***

La réalisation de la présente étude nous a permis de montrer que chaque bactérie a leur propre spécificité à former un biofilm. Les trois souches choisies durant ce travail ont donné des résultats posants qui nous ont permis de démontrer que le milieu de croissance, l'acidité et la température influencent la formation du biofilm de celles-ci.

Le biofilm est une communauté de microorganisme mono ou poly-microbien. Il est le mode de vie naturel des espèces bactériennes, il se forme par plusieurs étapes bien distinctes (attachement réversible, attachement irréversible, début de la formation des micro-colonies, maturation et dispersion du biofilm). La matrice du biofilm est majoritairement composée de l'eau et des polysaccharides. D'un point de vue microscopique, le biofilm forme une architecture et une organisation particulière et du point de vue macroscopique, il forme des rides. Il faut mentionner que le biofilm se forme sous l'influence de plusieurs facteurs. La formation de biofilms est influencée par le type de support. De façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité d'une surface et la présence préalable de films protéiques influencent l'attachement des micro-organismes à cette surface et favorisent la formation d'un biofilm. Les biofilms se fixent plus facilement sur des surfaces recouvertes de protéines ou de glucides que sur des surfaces recouvertes de lipides, et les biofilms se trouvant à la surface de la plaque forment un anneau.

Comme perspectives, et pour compléter notre étude, il serait intéressant à l'avenir de:

- ❖ Identifier précisément les polysaccharides et les protéines formés au cours du développement bactérien pour fournir un traitement sur mesure adapté aux différents stades de formation du biofilm
- ❖ Développer une nouvelle technologie utilisant les enzymes afin de combattre et même de détruire les biofilms
- ❖ Améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation des biofilms, afin de trouver de nouveaux moyens de prévenir ou de traiter les infections associées aux biofilms.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ALNNASOURI M.** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. [Thèse de doctorat : Ressources Procédés Produits Environnement]. Lorraine : Université de Limoges, 2010 ; 161p.
2. **ARDRE A.** Dynamique de formation des biofilms de *Bacillus subtilis* à l'interface eau-air : expériences et modélisation. Biophysique [Thèse de Doctorat : Physique]. Paris-Sud : Université de Paris Sud, 2015 ; 137p.
3. **AUGER M.** Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques d'*Escherichia coli*: impact de la modification des conditions expérimentales. [Thèse de Doctorat : Biologie médicale]. Nantes : Université de Nantes, 2012 ; 83p.
4. **AYE A.M.** Mise en évidence du système de communication Quorum Sensing impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée. [Thèse de Doctorat : Microbiologie/Biochimie]. Toulon : Université de Toulon, 2015 ; 245p.
5. **BEAUDRY F.M.** Etude sur les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez le porc à l'abattoir au Québec Canada. [Mémoire de Master : Microbiologie]. Montréal : Université de Montréal, 2011 ; 96p.
6. **BENDOUAH Z.** Implication des biofilms dans la rhinosinusite chronique et l'évaluation des traitements avec un modèle *in vitro*. [Mémoire de Master : Recherche clinique]. Montréal : Université de Montréal, 2008 ; 110p.
7. **BERNIER L.J** Prévalence et caractérisation de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline d'origine aviaire au Québec. [Mémoire de Master : Microbiologie]. Montréal : Université de Montréal, 2015 ; 112p.
8. **BILODEAU C.** Impact de l'hyperglycémie et de l'infection sur le transport ionique, la réparation épithéliale et l'action des correcteurs dans les voies aériennes en Fibrose kystique. [Mémoire de Master : Sciences biomédicales]. Montréal : Université de Montréal, 2015 ; 143p.
9. **BOUKHATEM L.** Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif nonfermentant isolés au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen. [Mémoire de Master : Microbiologie]. Tlemcem : Université Aboubekr Belkzaid Tlemcem, 2013 ; 54p.
10. **BOUTALED N.** Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. [Thèse de Doctorat : Chimie]. Bretagne-Sud : Université de Bretagne-Sud, 2007 ; 153p.

11. **CHARLEBOIS A.** Étude sur le biofilm et les mécanismes de résistance à la bacitracine chez *Clostridium perfringens*. [Thèse de Doctorat : Microbiologie]. Montréal : Université de Montréal, 2015 ; 213p.
12. **CHRISTENSEN ; JAIME E. ; MOLINA M.D. ; SPILIOPOULOU I. ; CORDERO A.J. ; FERNANDEZ R.R. ; FOKA A. ; GOMEZ B.E.** Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus spp.* From retrieved orthopedic prostheses. *ActaOrthop.* 81(6): 674-679.
13. **COURNET A.A.** Etude de la catalyse microbienne de la réduction électrochimique du dioxygène [Thèse de Doctorat : Ingénieries Microbienne et Enzymatique]. Toulouse : Université Toulouse III – Paul Sabatier, 2010 ; 151p.
14. **CUEVAS R.G.** Effets génotoxiques des souches d'*Escherichia coli* produisant la Colibactine. [Thèse de Doctorat : Microbiologie]. Toulouse II : Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2010 ; 106p.
15. **DESPLACES N. 2011** <http://www.infectiologie.org.tn>
16. **DJELLOUL D.S.** Détection de biofilm à staphylocoques sur cathéters veineux. [Mémoire de Master : Biochimie appliquée]. Tlemcen : Université Abou BekrBelkaid- Tlemcen, 2009 ; 67p.
17. **FAILLE A.** Identification de composés naturels contre *Saprolegnia sp.*, un champignon pathogène en aquaculture. [Mémoire de Master : Microbiologie et Immunologie]. Montréal : Université de Montréal, 2010 ; 58p.
18. **FAURE K., KIPNIS E., GUERY B.** Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa*.
19. **FILLOUX A., VALLET I.** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Med. Sci.* 2003, 19(1) : 77–83.
20. **GRASTEAU A.** Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [Mémoire de Master : Microbiologie]. Montréal : Université de Montréal, 2011 ; 108p.
21. **HAFIANE A.** Caractérisation des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de la fibrose kystique par différentes méthodes de typage. [Mémoire de Master : Sciences biomédicales]. Montréal : Université de Montréal, 2007 ; 82p.
22. **HASSAN N.** L'entérotoxine STb d'*Escherichia coli* délge la claudine-1 des jonctions serrées. [Mémoire de Master : Sciences vétérinaires]. Montréal : Université de Montréal, 2014 ; 79p.

23. **HICHEM C.** Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane. [Thèse de Doctorat : Sciences agricoles]. Grenoble : Université de Grenoble, 2012 ; 263p.
24. **IRIMES C.** Caractérisation génétique, phénotypique et formation de biofilm des souches de *Candida albicans* répondant ou non au farnésol. [Mémoire de Master : Médecine]. Montréal : Université de Montréal, 2010 ; 136p.
25. **KARA T. I.** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. [Thèse de doctorat : Biologie]. Tlemcen : Université Abou BekrBelkaid-Tlemcen, 2014 ; 84p.
26. **KHALILZADEH P.** Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. [Thèse de Doctorat]. Toulouse III : Université Paul Sabatier, 2009 ; 328p.
27. **MADODA N.D.** Étude de l'effet d'agents potentiellement perturbateurs de la structure des biofilms sur la diffusion des macromolécules dans les biofilms de *Streptococcus mutans* : cas de l'EDTA et de l'aspirine. [Mémoire de Master : Chimie]. Montréal : Université de Montréal, 2014 ; 73p.
28. **Mc NAMARA C.J., LEFF L.G.** Bacterial community composition in biofilms on leaves in a northeastern stream. *Journal of the North American Benthological Society*. 2004, 23(4): 677-685.
29. **MEZAACHE S.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. [Thèse de Doctorat : Microbiologie]. Université Ferhat Abbas Sétif, 2012 ; 141p.
30. **OTHMANI A.** Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à sa surface. [Thèse de doctorat : Ecologie Chimique Marine]. Toulon : Université de Toulon, 2014 ; 273p.
31. **OUBEKKA S.D.** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* Apport de la microscopie de fluorescence multimodale. [Thèse de Doctorat : Microbiologie]. Paris Sud XI : Université Paris Sud XI, 2012 ; 187p.
32. **PAROT S.** Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. [Thèse de doctorat : Génie des Procédés et de l'Environnement]. Toulouse : Institut National polytechnique de Toulouse, 2007 ; 229p.

33. **PAROT S.** Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. [Thèse de Doctorat : Génie des Procédés et de l'Environnement]. Toulouse : Institut national polytechnique de Toulouse, 2007 ; 229p.
34. **PECASTAINGS S.** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. [Thèse de Doctorat : Ingénieries Microbienne et Enzymatique]. Toulouse III : Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2010 ; 251p.
35. **PLANCHON S.** Aptitude de *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus xylosus* à former des biofilms. Etude d'une souche "biofilm-positif" par une approche protéomique [Thèse de Doctorat : Sciences des Aliments]. Clermont-Ferrand II : Université de Blaise Pascal, 2006 ; 235p.
36. **PURSWANI J., JUAREZ B., RODELAS B., GONZALEZ B, LOPEZ J., POZO C.** Biofilm formation and microbial activity in a biofilter system in the presence of MTBE, ETBE and TAME. *Chemosphere*. 2011, 85(4): 616-624.
37. **RASAMIRAVAKA T.** Inhibition du mécanisme de quorum sensing et de la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* par des composés bioactifs de *Dalbergia trichocarpa* (Fabaceae). [Thèse de Doctorat : Biochimie]. Bruxelles : Université de Bruxelles, 2014 ; 174p.
38. **RASAMIRAVAKA T., LABTANI Q., DUEZ P., JAZIRIL M.E.** The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*. 2014, 2015(2015): 1-17.
39. **REBIAHI S.A. ; RAHMOUNAM. ; SEDDIKIB S.M.L. ; KADIA K. ; BELHADJIC F. ; CHABNIC N. ; KUNKELD D.** Infections nosocomiales causées par *Staphylococcus aureus* producteur de biofilm dans l'unité de néonatalogie de l'établissement hospitalier spécialisé mère-enfant de Tlemcen, Algérie. *Journal de pédiatrie et de puériculture*. 2014, 27 : 228-235.
40. **ROCHEMONTEIX C.A.** Les biofilms et la peau. [Thèse de doctorat : Vétérinaire]. Creteil : Ecole Nationale Vétérinaire, 2009 ; 141p.
41. **ROUX A., GHIGO J.M.** Les biofilms bactériens. *Bull. Acad. Vét.* 2006, 159(3) : 261-268.
42. **RUIMY R., ANDREMONT A.** Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*: mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Science direct*. 2004, 13 : 176-184

43. **SALACHA R.** Les Patatines de *Pseudomonas aeruginosa* : Sécrétées ou non Sécrétées ? Telle est la question. [Thèse de Doctorat : Microbiologie moléculaire et Biotechnologies]. Méditerranée : Université de la Méditerranée, 2010 ; 142p.
44. **SECK R.** Résistance des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* isolées d'infections urinaires. [Thèse de Doctorat : Pharmacie]. Dakar : Université Cheikh AntaDiop de Dakar, 2005 ; 61p.
45. **SQUINAZI F.** Biofilm et matériaux des réseaux intérieurs de distribution d'eau. Paris : Edition 2013. 2013 ; 102p.
46. **www.bacteriainphotos.com**
47. **www.futurasciences.com**
48. **www.safewater.org**
49. **www.textbookofbacteriology.net**
50. **YANNICK D.N., TREMBLAY, SKANDER H., MARIO J.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. The *Canadian Journal of Veterinary Research* 2014, 78 : 110-116.
51. **YETERIAN E.** Inhibition du mécanisme de quorum sensing et de la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* par des composés bioactifs de *Dalbergia trichocarpa* (*Fabaceae*). [Thèse de Doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie]. Strasbourg : Université de Strasbourg, 2010 ; 161p.

ANNEXES

Annexe 1 : *Staphylococcus aureus***+ Classification :****Règne :** BACTERIA**Division :** FIRMICUTES**Classe :** BACILLI**Ordre :** BACILLALES**Famille :** STAPHYLOCOCCACEAE**Genre :** *Staphylococcus***Espèce :** *aureus***Annexe 2 : *Escherichia coli*****+ Classification****Règne :** BACTERIA**Division :** PROTEOBACTERIA**Classe :** GAMMAPROTEOBACTERIA**Ordre :** ENTEROBACTERIALES**Famille :** ENTEROBACTERIACEAE**Genre :** *Escherichia***Espèce :** *coli***Annexe 3 : *Pseudomonas aeruginosa*****+ Classification :****Règne :** BACTERIA**Division :** PROTEOBACTERIA**Classe :** GAMMAPROTEOBACTERIA**Ordre :** PSEUDOMONADALES**Famille :** PSEUDOMANACEAE**Genre :** *Pseudomonas***Espèce :** *aeruginosa*

Annexe 4: Cristal violet ou violet de Gentiane

La méthode de quantification de la formation du biofilm utilisant le CV a été décrite la première fois Christensen *et al* en 1985, puis modifiée pour augmenter sa précision et permettre la quantification de la biomasse totale par resolubilisation du colorant. Le CV est un colorant basique qui se lie aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaires. Les bactéries vivantes, les bactéries mortes et la matrice exopolysaccharides sont donc colorées par le CV. Cependant, de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques peuvent influencer cette fixation. Le CV est un produit cancérigène, nocif en cas d'ingestion, d'inhalation ou de contact avec la peau et toxique pour l'environnement aquatique.

Annexe 5: Quorum sensing (QS)

Historique de la découverte du QS :

Le QS a été observé pour la première fois chez *Vibrio fisheri*, renommé depuis *Bacterium fisheri* puis *Aliivibrio fisheri*, une bactérie bioluminescente, symbiotique vivant dans l'organe lumineux de certains céphalopodes comme la sépiole. Quand les vibrions sont sous forme planctonique (à l'état libre), la concentration d'auto-inducteurs est faible, et les cellules ne sont pas luminescentes. Au contraire, dans l'organe lumineux de la sépiole, où les vibrions sont très nombreux (environ 10^{11} cellules par mL), les auto-inducteurs stimulent la transcription du gène de la luciférase, qui produit une enzyme (luciférase) capable de produire de la lumière à partir d'ATP.

Principe généraux :

Le QS correspond au mécanisme de synchronisation de l'expression (ou répression) de gènes particuliers, au sein d'une population bactérienne et en fonction de la densité de cette population. Elle implique la capacité de bactéries à communiquer avec leurs congénères via des signaux moléculaires, et éventuellement, pour certaines espèces (archées), à disposer d'une horloge biologique endogène (rythme circadien bactérien).

✚ Mécanisme général du QS :

Les bactéries qui utilisent le QS produisent des signaux moléculaires dits : « auto-inducteurs ».

- Lorsque la densité de la population bactérienne est faible, la diffusion réduit rapidement la concentration de l'auto-inducteur dans l'environnement.
- Au contraire, avec la multiplication cellulaire dans l'espace confiné, la densité de la population augmente, et la concentration de l'auto-inducteur dépasse un seuil critique qui est alors perçu par les bactéries qui le produisent : on dit que le quorum est atteint.
- Cette perception active souvent la surproduction du signal auto-inducteur, conduisant ainsi une boucle de rétroaction positive permettant de synchroniser sa perception au sein de la population microbienne.

La présence des auto-inducteurs est perçue par des récepteurs protéiques intracellulaires. Ces récepteurs fixent l'auto-inducteur (dont la concentration intracellulaire reflète la concentration extracellulaire). Le récepteur ainsi activé reconnaît certaines séquences d'ADN, spécifiques des gènes régulés par le QS et active ou réprime leur expression.

Sans que l'on puisse véritablement parler de super-organisme, la population peut alors localement réagir un peu comme une colonie cohérente, plus que comme une simple somme d'individus. Les auto-inducteurs fonctionnent un peu comme des hormones, ils sont perçus par les bactéries à des concentrations très faibles (de l'ordre de 1pmol à 1µmol). Parmi les signaux connus, on peut citer les N-acylhomosérine lactones (NAHL), les butyrolactones, des peptides cycliques tels ComX, ou l'auto-inducteur 2 (AI-2), un des seuls composés biologiques connus contenant du bore.

✚ Les différents types de QS :

Il existe de nombreuses molécules de communication cellulaire appartenant au système du QS. Les molécules utilisées dépendent de l'espèce bactérienne considérée, mais il est possible de classer ces systèmes de communication en trois grandes catégories qui sont :

- Système LuxI/R
- Système olyopeptide
- Système hybride

Title : EVALUATION DE LA FORMATION DU BIOFILM SOUS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE (MILIEU DE CROISSANCE, ACIDITE ET TEMPERATURE) CHEZ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Author : RAMBELOMAMONJY Hantamalala

Encadreur : Docteur RASAMIRAVAKA Tsiry

ABSTRACT

Biofilms are communities of microorganisms enclosed in an extracellular matrix attached to various surfaces. They create a model for the development of biofilms in five stages: reversible adhesion to a surface of bacteria in the plankton phase, irreversibility of the adhesion due to the synthesis of structures on the bacterial surface, formation of microcolonies, development of these microcolonies producing the maturation stage, and finally colonisation of new niche. Biofilms presents for negative impacts in health and industrial sectors, however they also play a crucial ecological role. The main objective of this work was to estimate the formation of the biofilm at three different bacterial cash with conditions of different culture (middle of growth, acidity and temperature) by the method of plates them at 96 wells. These conditions of cultures have little influence on the formation of the biofilm at *S. aureus*. On the other hand, the formation of the biofilm at *E. coli* and *P. aeruginosa* is influenced by these conditions of culture of where, the obtaining of different results. In spite of the setting in work of the preventive measures, the biofilms is difficult to éradiquer because of their characteristic tolerance to high doses of antibiotics.

Key words: Biofilms, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Titre : EVALUATION DE LA FORMATION DU BIOFILM SOUS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE (MILIEU DE CROISSANCE, ACIDITE ET TEMPERATURE) CHEZ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Auteur : RAMBELOMAMONJY Hantamalala

Encadreur : Docteur RASAMIRAVAKA Tsiry

RESUME

Les biofilms sont des communautés de microorganismes englobés dans une matrice extracellulaire, fixées sur des surfaces naturelles ou artificielles. Ils établissent un modèle de développement en cinq étapes : adhésion réversible des bactéries de la phase planctonique à une surface, irréversibilité de l'adhésion correspondant à la synthèse de structure à la surface des bactéries, formation des microcolonies, puis développement de ces microcolonies traduisant le stade de maturation du biofilm et colonisation de nouvelles niches. Les biofilms présentent des impacts négatifs dans le domaine de la santé humaine, vétérinaire et celui de l'industrie, mais jouent également un rôle écologique capital. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la formation du biofilm chez trois espèces bactériennes différentes sous conditions de culture différentes (milieu de croissance, acidité et température) par la méthode des plaques à 96 puits. Ces conditions de cultures ont peu d'influence sur la formation du biofilm chez *S. aureus*. Par contre, la formation du biofilm chez *E. coli* et *P. aeruginosa* est influencée par ces conditions de culture d'où, l'obtention de différents résultats. Malgré la mise en œuvre des mesures préventives, les biofilms sont difficiles à éradiquer en raison de leur tolérance caractéristique à des doses élevées d'antibiotiques.

Mots clés : Biofilms, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

