

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université « Dr. Tahar Moulay » Saïda**

**FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



**Mémoire Elaboré en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie**

**Option : Microbiologie Appliquée**

**Présenté par**

**M<sup>elle</sup> : OUCI MALIKA**

**M<sup>elle</sup> : ZIGHEM SABRINE**

**Sur le thème intitulé**

**Biofilms mixtes, contexte  
et fonctionnement**

**Soutenu le 24 /10/2021 Devant le jury, composé de :**

<b>Président</b>	<b>HallaNourdine</b>	<b>MCB</b>	<b>U T. M. de Saïda</b>
<b>Examineur</b>	<b>Mederbal Mohammed Touiti</b>	<b>MAA</b>	<b>U T. M. de Saïda</b>
<b>Promoteur</b>	<b>Ghellai Lotfi</b>	<b>MCA</b>	<b>U T. M. de Saïda</b>

**2020/2021**

## *Remerciements*

Pour commencer, parce qu'il existe toujours un début à tout, nous remercions notre Dieu, le tout puissant, qui a donné la force, la patience, ainsi que le courage pour dépasser toutes les difficultés et terminer notre travail

Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur **Mr. Ghellai Lotfi** pour avoir accepté de diriger ce travail, ainsi que pour sa simplicité, son attention, sa prudence et sa générosité scientifique.

Nous tenons à remercier aussi les membres de jury **Mr. Halla Nourdine** et **Mr. Medebal Mohammed Touiti** qui ont accepté d'examiner ce travail de mémoire.

Sans oublier tous nos enseignants du département de Biologie  
Merci à toute personne qui a participé de près ou loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

## Dédicaces

*Je dédie ce mémoire à*

*Mes très chers parents qui m'ont soutenu tout au  
Long de mes études, qu'ils trouvent ici, le témoignage  
De ma gratitude devant l'immense sacrifice et devant  
L'affection qu'ils m'ont toujours portée.*

*A MON MARI :*

*A Mes sœurs : fatima, aicha, ilham yasmin*

*A Mon oncle Karima et Toute ma famille*

*A Tous mes amies, rachid, yousra.....*

*Mes collègues de la promotion 2020/2021*

*Et à tous ceux que j'aime*

*SABRINE*

## Dédicaces

*Tout d'abord, merci à Dieu Tout-puissant, qui m'a de terminer ce travail et qui m'a inspiré santé et bien-être..*

*Et à celui qui les mots ne peuvent remplir son droit, à mon cher père, que Dieu prolonge sa vie : et à celui qui a un cœur patient et tendre, à celui dont les prières ont illuminé ma vie, ma chère mère, mes sœurs (Rakia, Aicha, ma cher fatima, Youssra*

*Et ma princesse Asile). Je dédie cette remise de diplôme à mes chers frères Boubaker et Miloud, ainsi mes aimables Mokhtar, Ali. Et ma chère, Et ma chère amie et m'avié Sara, Et tous les amis.*

**MALIKA**



## Résumé :

Les biofilms sont des structures très complexes composées, le plus souvent, de cellules microbiennes comprenant des bactéries, des champignons, des cyanobactéries et microalgues qui adhèrent à des surfaces biotiques ou abiotiques et sont enfermées dans des substrats qui peuvent être des exopolysaccharides (EPS) excrétés par ces cellules. La formation de biofilm est un processus très spécifique, dans lequel les cellules microbiennes passent du mode planctonique (libre) au mode sessile (biofilm). Ce processus, dépend de certains facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que les propriétés de surface de la cellule microbienne et du matériau, la composition du milieu, etc. Généralement, sous cette forme sessile, les microorganismes deviennent plus résistants aux agents antimicrobiens, en particulier aux antibiotiques. Les biofilms peuvent être monomicrobien contenant un seul type d'espèce ou polymicrobien comprenant des espèces mixtes (bactéries-bactéries, (bactéries –levures) et (bactéries – moisissure), dans ces biofilms, l'interaction courante entre les micro-organismes est la compétition pour l'acquisition de nutriments et l'occupation de l'espace. L'étude des biofilms mixtes est un domaine très intéressant attirant de plus en plus l'intérêt des chercheurs dans plusieurs disciplines car les applications sont nombreuses et variées.

**Mots clés :** biofilms monomicrobiens, biofilms mixtes, bactéries, champignons, levures, structure, fonctionnement.

## ملخص:

البيوفيلم ( Biofilm ) عبارة عن مجتمعات متكونة من خلايا ميكروبية منها البكتيريا والفطريات و البكتيريا الزرقاء، والطحالب الفطرية التي تلتصق ببعض الأسطح و التي قد تكون حيوية أو غير حيوية، والتي تلتزم بكيانات خاملة أو نشطة و محاطة بركائز قد تكون متعددة السكاريد الخارجية، بحيث يعتبر تكوين البيوفيلم عملية محددة للغاية ، معلومة البيوفيلم جد معقدة نظرا لإمكانية إنتقالها من تجمع بسيط متكون من إتحاد نوع واحد من الكائنات الحية الدقيقة ما يسمى بالغشاء الحيوي البسيط أو العوالق إلى وضع جد معقد يدعى البيوفيلم المعقد ( Biofilm mixtes ) ، تعتمد هذه العملية على بعض العوامل الداخلية و الخارجية مثل الخصائص السطحية للخلية الميكروبية، و المواد ، و خصائص الوسط ..إلخ ، عادة في هذا الشكل المعقد تصبح الكائنات الحية الدقيقة أكثر مقاومة للعوامل المضادة للمكروبات ، خاصة المضادات الحيوية، يمكن أن يكون البيوفيلم أحادي الميكروبات يحتوي على نوع واحد، أو يمكن أن يكون متعدد الميكروبات يشتمل على أنواع مختلطة (بكتيريا – بكتيريا)، (بكتيريا – خميرة)، (بكتيريا-فطريات)، (بكتيريا – طحالب) ، في البيوفيلم المعقد يكون التفاعل المشترك بين الكائنات الحية الدقيقة هو التنافس على إكتساب المغذيات و إحتلال الفضاء . تعد دراسة الأغشية الحيوية المختلطة مجالا مثيرا للاهتمام للغاية بحيث يجذب إهتماما متزايدا من الباحثين في العديد من التخصصات لأن التطبيقات متعددة و متنوعة.

**الكلمات المفتاحية:** البيوفيلم الميكروبي، البيوفيلم المختلط، البكتيريا، الفطريات، الخميرة، التركيب، الهياكل.

## **Summary:**

Biofilms are very complex structures composed, most often, of microbial cells including bacteria, fungi, cyanobacteria and microalgae, which adhere to biotic or abiotic surfaces and are enclosed in substrates, which may be exopolysaccharides (EPS) excreted by these cells. Biofilm formation is a very specific process, in which microbial cells change from planktonic (free) mode to sessile (biofilm) mode. This process depends on certain intrinsic and extrinsic factors such as the surface properties of the microbial cell and of the material, the composition of the medium, etc. Usually, in this sessile form, microorganisms become more resistant to antimicrobial agents, especially antibiotics. Biofilms can be monomicrobial containing a single type of species or polymicrobial comprising mixed species (bacteria-bacteria, (bacteria-yeasts) and (bacteria-mold), in these biofilms, the common interaction between microorganisms is the competition for the acquisition of nutrients and the occupation of space. The study of mixed biofilms is a very interesting field attracting more and more the interest of researchers in several disciplines because the applications are numerous and varied.

**Keywords:** Monomicrobial biofilms, mixed biofilms, bacteria, fungi, yeast, structure function.

## Tables des matières

Remerciement	
Dédicace	
Liste des Figure	
Liste des Tableaux	
Liste des Abréviation	
Introduction .....	1

### ***Chapitre I : Description biologique des biofilms microbiens***

1. Historique .....	03
2. Généralité sur les biofilms :.....	03
3. Structure de biofilm :.....	05
3.1 Une grande diversité de biofilm :.....	06
3.2 Une organisation structurale de biofilm :.....	07
3.3 Une organisation stratifiée :.....	07
4 .Facteurs favorisent la formation d'un biofilm .....	08
4.1 Caractéristique de la surface .....	08
4.2 Caractères du milieu :.....	08
4.3 Propriétés des cellules .....	08
5. Composition de biofilm :.....	08
5.1 Polysaccharide :.....	09
5.2 Les protéines ;.....	10
5.3 ADN extracellulaire :.....	10
5.4 Les canaux :.....	11
5.5 Les lipides :.....	12
6. Mise en place d'un biofilm :.....	14
6.1 Adhésion réversible :.....	14
6.2 Adhésion irréversible :.....	15
6.3 Accumulation des microcolonies :.....	15
6.4 Maturation de biofilm :.....	16
6.5 -détachement et dispersion .....	16
7. Les mécanismes régulateurs de la formation de biofilm :.....	17
7.1 Quorum sensing :.....	17
7.1.1 Définition et mécanisme ;.....	17
7.1.2 Les molécules de Qs ;.....	19
7.1.3 Le rôle de QS :.....	19
7 1.4 Altération du Qs conséquence :.....	20

7.2	Régulation génétique par les cellules fixées .....	20
7.3	Les autres mécanismes régulateurs de la formation du biofilms comme les polysaccharides, le GPM-c et par l'acétyle phosphate et l'alarmone ; .....	20
8	Infections associées aux biofilms .....	22
8.1	Infection chronique .....	22
8.1.1	L'endocardite infectieuse .....	23
8.1.2	La mucoviscidose .....	23
8.1.3	Infection urinaire récidivantes .....	23
8.1.4	infections associées aux plaies chroniques .....	23
8.1.5	Pathologie buccodentaires et oto-rhino-laryngologie .....	24
9.	résistances et tolérances aux antibiotiques .....	24
9.1	Résistances de biofilm aux antibiotiques .....	24
9.2	Tolérance aux antibiotiques .....	25
10.	les antibiotiques comme signaux activateurs de biofilm .....	25
11.	Empêchement aux systèmes immunitaire :... ..	27
12.	les biofilms sont ubiquitaire:.....	28
12.1	Dans l'environnement .....	28
12.2	Dans le domaine industriel .....	29
12.3	Chez l'homme .....	29
12.4	Dans le domaine médical .....	29

## ***Chapitre 02 : Biofilms mixtes et mécanismes de fonctionnement***

1.	Introduction: .....	32
2.	historique et définition de biofilm mixte .....	33
2.1	Historique .....	33
2.2	Définition .....	34
3.	Une communauté bactérienne multi-espèce .....	34
4.	caractérisation des biofilms microbiennes .....	35
5.	Exemple de matrice extracellulaire de biofilm multi-espèce .....	35
6.	biofilm mixte (bactérie – bactérie).....	37
6.1	Introduction .....	37
6.2	Exemple biofilm mixte (bactérie-bactérie) P.aeruginosa et K.pneumoniae. ....	38
7.	Biofilm mixte (bactérie –levure) ;.....	39
7.1	Introduction .....	39
7.2	Isolement et identification .....	40
7.3	Résultats .....	43
7.4	Résultats .....	43
8.	Biofilms mixtes (bactérie – champignon) .....	44

8.1 Introduction :	44
8.2 Exemples de biofilms mixtes (bactérie – champignon) ; (Stenotrophomonas maltophilia-Aspergillus fumigatus) :	45
9. Biofilms mixtes (Bactérie –Algue).	48
9.1 Mutualisme	49
9.2 Commensalisme	50
9.3 Parasitisme	50
9.4 Etude cas d'intéaction entre Algue et Bactérie	50
10. biofilms mixtes (Bactérie –protozoaire).	53
11. Biofilm virale	55

## ***Chapitre 03 : les méthodes d'études de biofilm***

1. Introduction :	61
.2 Diversité des biofilms et Diversité des méthodes d'étude :	61
3 les méthodes d'études de biofilm :	62
3.1 Choix des micro-organismes	62
3.2 La polyculture : meilleur reflet de la réalité biologique :	62
4 Les différentes méthodes d'obtentions des biofilms :	63
5 les différentes méthodes d'observations des biofilms :	63
5.1 La microscopie électronique à balayage MEB :	63
5.2 La microscopie confocale à balayage laser	64
5.3 Etude de laboratoire versus étude :	65
5.4 Techniques de prélèvements :	65
5.4.1 Rinçage :	65
5.4.2 Chiffonnettes :	66
5.4.3 Ecouvillonnage :	66
5.4.4 Récupération :	66
6 Analyse microbiologique :	66
7 Les méthodes caractérisations des biofilms :	67
7.1 Analyse des biofilms :	67
7.1.1 Analyse in situ.	67
7.1.2 Spectroscopie infrarouge ATR_FTIR	67
7.1.2.1 principe.	67
8 Marquage et observation des biofilms :	70
8.1 Analyses ex situ. :	72
8.1.1 Récupération des cellules bactériennes et dénombrement :	72
8.1.2 Analyse ex situ de l'ADN extracellulaire :	72
8.1.3 Quantification de l'ADN extracellulaire :	73
8.1.4 Visualisation de l'ADNe par électrophorèse en gel d'agarose :	73

8.2 Amplification PCR .....	74
Conclusion Générale .....	77
Référence Bibliographie .....	78

## *Liste Des Figures*

<b>Figure 01</b> : biofilms d'Escherichia coli O157 ; H7. Souche 4385OR développé sur des coupons de verre .....	05
<b>Figure 02</b> : Aspect de biofilm de P. aeruginosa par microscopique .....	05
<b>Figure 03</b> : caractérisation des canaux d'un biofilm de Bacillus subtilis .....	11
<b>Figure 04</b> : composition de biofilms. ....	13
<b>Figure 05</b> : cycle de vie des biofilms .....	14
<b>Figure 06</b> : schématisation des comportements contrôlés par le Qs .....	18
<b>Figure 07</b> : schéma représentant le changement de mode de vie de la bactérie en fonction de la concentration intracellulaire en c-di-GMP .....	21
<b>Figure 08</b> : biofilm bactérienne mixte les bactéries fluorescentes vertes ou rouges sont visualisées par l'utilisation d'un microscope confocale .....	35
<b>Figure 09</b> : Détection des adhésions amyloïdes dans des boues activées par marquage à l'aide d'un anticorps anti-WO1 (a) ou le marqueur thioflavine T(ThT) (b), tous deux spécifiques des fibres amyloïdes et couplés à l'iodure de propidium (en rouge) .....	36
<b>Figure 10</b> : points clés de la définition du biofilm .....	37
<b>Figure 11</b> : Biomasse des biofilms multi-espèces bactériennes sur milieu Muelle Hinton liquide par la méthode de Cristal Violet .....	42
<b>Figure 12</b> : Biomasse des biofilms multi-espèces (bactérie – levure) sur milieu RPMI1640 par la méthode Cristal Violet .....	42
<b>Figure 13</b> : Aperçu schématique sur les voies potentielles d'adaptation bactérienne contre la prédation par les protozoaires et la transition hypothétique de la résistance au pâturage à la pathogénèse. Les flèches bleues indiquent les deux stratégies divergentes d'adaptations pré-ingestion (a-e) et post-ingestion (f-h) émergeant des interactions bactéries-protozoaires. Notez le degré croissant de complexité et de coopération des mécanismes de protection. Les flèches rouges indiquent l'origine potentielle de la pathogénèse.....	54
<b>Figure 14</b> : Les biofilms viraux, un nouveau mode de dissémination du virus.....	57
<b>Figure 15</b> : Biofilms et virus. Les virus sont représentés dans l'espace extracellulaire sous forme planctonique ou biofilm.....	59
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique du FTIR-ATR, ns correspond à l'indice de réfraction de l'échantillon, nc l'indice de réfraction du cristal et l'angle d'incidence ( <b>Humbert and Quilés 2011</b> )	68

<b>Figure 17</b> : mode vibration des molécules (illustrés par une molécule CH <sub>2</sub> ) ( <b>Dalibert and servant 2000</b> ).....	69
<b>Figure 18</b> : spectre ATR-FTIR d'un culot partiellement déshydraté de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> fluorescences en fin de phase exponentielle de croissance ( <b>Humbert and Quilés 2011</b> ) .....	69

### Liste des Tableaux

<b>Tableau 01</b> : Composition globale de biofilm. ....	09
<b>Tableau 02</b> : Répartition des souches identifiées par prélèvement et par patients. ....	41
<b>Tableau 03</b> : Bases de l'interaction cellulaire dans les biofilms.....	48
<b>Tableau 04</b> : Exemples d'interactions microalgues-bactéries ayant des effets positifs sur la croissance des algues et l'accumulation des composés précieux.....	52
<b>Tableau 05</b> : Caractéristiques des amorces utilisées .....	74



## Liste des abréviations

- P.aeruginosa** : Pseudomonas aeruginosa.
- K.Pneumoniae** : Klebsiella Pneumoniae
- CSLM**: Confocal Laser Scanning Microscopy.
- ADN** : Acide DésoxyriboNucléase.
- EPS** : Substance polymérique extracellulaire.
- MEC** : matrice Extracellulaire.
- MEB** : microscopie électronique à balayage.
- Da**: Dalton.
- Qs**: Quorum sensing.
- S.intermedius** : Streptocoquus intermedius.
- S.mutans** : Streptocoque mutans.
- B.subtilis**: Bacillus subtilis
- E.faecalis**: Escherichia faecalis.
- E.coli**: Escherichia coli.
- ATP**: Adenosine triphosphate.
- CSP**: Competence Stimulating Peptide.
- LPS** : lipopolysaccharides.
- G<sup>-</sup>** : Gramme Négative.
- GMP**: Guanine mono phosphate.
- GTP**: Guanine triphosphate.
- H.influenza** : Haemophilis influenzae.
- CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice.
- IL** : Interleukine.
- ATB** : Antibiotique.
- ARN** : Acide Ribonucléique.
- GFP** : Green Fluorescent Protéine.
- DSRed** : Discosoma sp red Fluorescence Protein.
- TSA** : Trypocacéine Soja Agar.
- DM** : Dispositif Médical.

**DDB** : Dilatations de branche.

**BPCO** : Broncho pneumopathie chronique obstructive.

**PCR** : Réaction de polymérisation en chaîne

**ADNe** : Acide DésoxyriboNucléase extracellulaire.

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**UV** : Ultra Violet.



# *Introduction*

## **Introduction :**

L'existence du biofilm a commencé il y a plus de 3,8 milliards d'années et aujourd'hui omniprésent sur terre (**Denkhaus et al, 2007**). On comprend maintenant que les biofilms sont universels, se produisant de nombreux habitats environnementaux, ils sont présents sur des surfaces biotiques, tel est le cas de la carie dentaire, et les surfaces abiotiques tels que les dispositifs médicaux, les équipements industriels, et même sur les ustensiles culinaires.

Characli (1989), définit un biofilm comme une communauté microbienne adhérent à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymère extracellulaire. R'appelons q'un microbe ou microorganisme et un organisme vivant généralement unicellulaire, invisible les protozoaires, les champignons microscopiques, les bactéries et les virus sont des microbes capable produire de biofilm sous des conditions favorables monoespèces (**Marc et al ;2002**) sous des conditions favorables , ou multi-espèce à partir la communauté microbienne et la coopération des microbes entre eux ( Bactérie –Bactérie ) ; ( Bactérie-levure ) ; (Bactérie-Champignon ) ; ( Bactérie – Protozoaire ) , et biofilm viral, par des molécules de signalisation produites par les microbes qui permettent la communication entre les biofilms multi-espèces .

Ce mémoire a pour objectif d'établir un aperçu bibliographique général sur les biofilms polymicrobiens et leur mécanisme de fonctionnement. Le manuscrit comporte trois chapitres portant sur :

- i/ Généralités sur discription biologique des biofilms microbiens
- ii/ Biofilms mixtes et mécanisme de fonctionnement
- iii/ Méthodes d'études des biofilms



## Chapitre I

# *Déscription biologique des Biofilms microbiens*

## 1. Historique

La première description des bactéries agrégées a été publiée par **Anthony Van Leeuwenhoek**. En effet il observa en 1863 la présence des microorganismes issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire.

Une année après, **Leeuwenhoek** à rapporter un document qui a été considéré comme le premier papier scientifique sur le biofilm.

**Plus pasteur** en 1864 décrit « la mère de vinaigre » (à l'origine de fermentation acétique de l'éthanol pour la fabrication du vinaigre) comme étant constitué d'agrégat bactérienne de *Mycoderma acéti*.

Jusqu'à la fin de 20<sup>ème</sup> siècle, ce mode de vie sensible tombe dans l'oubli les bactéries sont alors majoritairement considérées sous leur forme planctonique (**Murray et Lopez, 1997**).

L'existence du mode de vie en biofilm a été envisagée depuis les travaux de **Henriçi et Zobell**. En 1992 observa sur des lames de verre plongées dans un aquarium, le développement de bactérie sur le surface des lames qui s'épaissit progressivement, ses observations de microorganisme dans l'eau lui permettent d'établir une évidence accepté seulement depuis quelque décennies : les bactéries sont majoritairement adhérees sur une surface pour croitre et non libre dans leur environnement.

**Henriçi** avança cette idée uniquement pour l'environnement aquatique en opposant les bactéries benthiques aux bactéries planctoniques (**Roux et Ghigo, 2006 ; Daddi oubkka ,2012 ; Pantaléon. 2015**).

Une hypothèse a été décrite dans une étude de **Cloude Zobell** qui démontra vers 1936 que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif d'élue en 1943 , il montra que de très faibles quantités des nutriments organiques s'absorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation des communautés bactériennes fixées sur les surfaces ( **Costerton , 2004 ; Roux et Ghigo , 2006 ; Pantaléon ,2015 ; Saloun,2015** ) .

Les plus importantes études physico-chimiques pourtant sur les biofilms datent des années 1970 avec les travaux de **Jones et al.**

## 2. Généralité sur les biofilms :

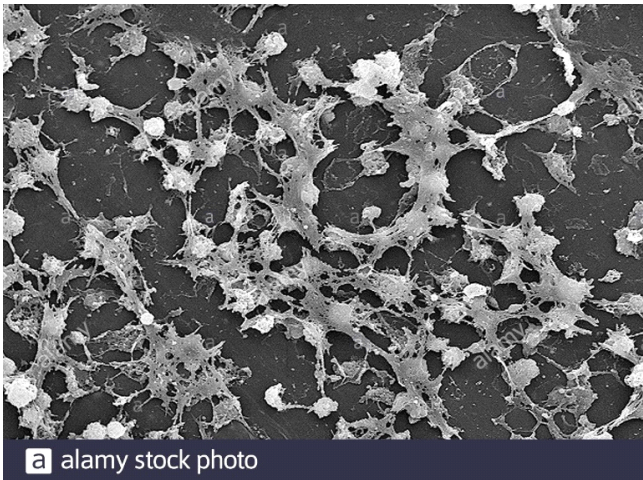
Le choix de quelques prototypes des bactéries comme organismes modèles en génétiques et en biologie moléculaire a découlé de l'utilisation aisée de ces espèces en cultures en suspension homogène, dans des milieux nutritifs liquides par affaitement définis, or il était

connue de long date que la vie des procaryotes est le plus rare que la vie fixé, une taille forme, de vie impliqué, une croissance en colonie et éventuellement la possibilité de déplacement sur les surfaces.

Des études en microscopie réalisé chez *E. coli* , *Bacillus subtilis* révèlent que de développement d'une colonie n'est en rien anarchique , il correspond à une croissance coordonné de la population , pouvant inclure un programme de différenciation cellulaire structuré à l'intérieure de la colonie , ce qui suggère l'implication d'échanges intercellulaires , une population ainsi fixé peut même acquérir une organisation beaucoup plus structuré , connue sous le nom de biofilm uni ou plurispécifiques , qui a été décrite comme « un assemblage de micro-organisme » et les produits extracellulaires associes et ordinairement attachés à une surface abiotique ou biotique ( **M.E bavey et GA .O'toole ,2000**).

L'intérêt pour biofilm résulte essentiellement de leur importance dans nombre de pathologie (contamination de prothèse infection opportuniste des poumons, résistances aux traitements antibiotiques ....etc.) plus fondamentalement étant donné que l'immense majorité des procaryotes peut organiser en structures de type des biofilms leur étude pouvait conduire à une connaissance plus précise de l'écophysiologie de leur constituant.

Si la majorité des microorganismes adaptent le mode de vie en biofilm cela veut dire que durent l'évolution , les bénéfices conférés par ces derniers sont largement supérieurs à la forme planctonique .En effet de l'union nait la force , des nouvelles propriétés sont intrinsèquement liées aux biofilms telles que la résistance à la dessiccation , la capture de nutriment , le rétention d'enzyme extracellulaire à l'origine de capacité digestive , décuplées l'échappement au système immunitaire de l'hôte , la tolérance aux antibiotiques etc. ....l'omniprésence des biofilms en découlent de nombreux processus , il sont par exemple implique dans le cycle biogéochimique de la plupart des éléments de l'hydrosphère et de la géosphère .



**Figure 01:** biofilms d'Escherichia coli O157; H7. Souche 4385OR développé sur des coupons de Verre (Baudin 2007).

**Figure 02 :** Aspect de biofilm de P. aeruginosa par microscopiques (Monroe , 2007).

### 3. Structures des biofilms :

Les premières études de biofilms ont fait appel à la microscopie électronique à balayage. Malgré l'inconvénient du préalable nécessaire de l'échantillon qui dans ce cas passe par une déshydrations avec tous les artefacts prévisibles, Cette technique reste toutefois un moyen d'étude efficace des biofilms l'utilisation du microscope confocal laser à balayage (CLSM) permet d'examiner les biofilms une situe.

Si la résolution en est moindre, la possibilité d'en marquer spécifiquement certains éléments est un atout précieux de cette technique, en l'associant à la microscopie par épi fluorescence.

Des colorantes fluorescences éventuellement associées à des techniques immunologiques permet de révéle la présence et l'organisation de certain composant au sien de biofilm l'ADN, l'acridine orange marquer des acides nucléiques, la détection immunologique spécifique des composants tels que les polysaccharides, font partie de la panoplie disponible.

L'étude par CLSM de biofilm très variés des biofilms, mono spécifique de laboratoire aux biofilms de écosystème naturel révèle une organisation plus au moins universel.

Dans les conditions naturelles les bactéries existent sous deux formes (Cultterbuck, 2007).

- Libre : mode de flottaison libre appelé forme planctonique.
- Sessile : attaché, sous forme de biofilm.



Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe la forme planctonique permet aux bactéries de proliférer et de coloniser de nouvelle riche c'est la forme minoritaire .Brièvement des bactéries produisent et accumulent des polymères extracellulaires, formant une matrice extracellulaire à forte teneur en eau. Les bactéries sont immobilisées au sein de cette matrice .leur proximité entre elle leur permet de réaliser des échanges de signaux et de nutriments, c'est cet ensemble qui forme le biofilm (**Clutterbuck, 2007**).

Ce mode de vie permet à des colonies des bactéries de persister à un endroit donné, sans proliféré, il conféré à la communication bactérienne une véritable protection contre un certain nombre de stress environnementaux comme la dessiccation ou encore l'action d'agent antimicrobienne, un biofilm à la capacité de devenir résistant aux réponses immunitaires innées et acquises de l'hôte. Les traitements antimicrobiens à des concentrations classiques l'utilisation ne permettent pas l'éradication des biofilms, l'étude de la structure des biofilms et des mécanismes de leur dynamique de formation a donc un latéré dans la recherche consternant les moyens de lutte contre les biofilms.

### **3.1 .Une grande diversité de biofilm :**

Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes, On parle respectivement de biofilm homogène ou de biofilm hétérogène, la plupart des biofilms rencontrés sont hétérogènes. la présence d'un espèce de microorganisme ou d'une autre au sein de biofilm indépendant des conditions environnementales , par exemple les biofilms éclairés par la lumière du soleil sont composés majoritairement d'organisme phototrophe , comme les algues ou les cyanobactéries , réalisent la photosynthèse et produisent leur biomasse à partir de carbone minéral , les biofilms formés en absence de lumière sont constitués principalement des bactéries hétérotrophes ( dégradation de la matière organique) et chimoitrophes ( transformation de substance minérale ) .

Les biofilms peuvent se former sur des surfaces biologiques ou inertes, d'une grand diversité ; tissus vivants, appareillage médical (sonde, cathéter, broncher) .système de canalisation industriel ou d'eau potable, surfaces immergées les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm.

Selon le type de support sur lequel se forme de biofilm, l'organisation structurale de ce dernier sera différente un biofilm fixé dans la lumière d'une canalisation à une structure très complexes et contient divers composants ; produits issus de réaction de corrosion boue algues unicellulaires et bactériose filamenteuses, un biofilm formé à la surface d'un cathéter à une

organisation plus simple on distingue des microcolonies de coques associées à une matrice d'exopolymère.

### **3.2 Une organisation structurale de biofilm :**

Les biofilms sont hétérogènes d'un point de vue structural, ils se forment sur des supports variés, ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de microorganismes, de cette diversité on peut néanmoins dégager certaines caractéristiques structurales communes à tous les biofilms. Un biofilm est constitué d'une fine monocouche de cellule à sa base (fixé à la surface du substrat), surmontée de plusieurs couches épaisses de cellules en fermées dans une matrice et reliées par des canaux aqueux. Il s'agit d'une organisation spatiale stratifiée, permettant des échanges (informations nutriments ..... ) et une coopération entre microorganismes.

### **3.3 - une organisation stratifiée :**

La couche la plus profonde de biofilm est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier , les cellules sont petites leurs métabolismes est anaérobie et leur croissance est latente , la couche superficielle du biofilm est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide entre ces deux couches des cellules , On trouve des cellules en micro-aérobiose l'organisation stratifiée des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grand Quantité dans les couches superficielles du biofilm , plus on avance vers les couches profondes du biofilm , moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses . Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zone de croissance différente des microorganismes (**Bury-Moné, 2007**).

Des simulations tridimensionnelles réalisées par informatique ont permis de montrer que les zones de croissance du biofilm sont caractérisées par la présence des larges structures en colons contrairement aux zones de croissances réduite ou l'on trouve un réseau étroit de structure entraînant ainsi une réduction des communications intercellulaires et de la croissance du biofilm (**Clutterbuk, 2007**).

Au sein du biofilm, les microorganismes morts ou lysés sont réutilisés comme nutriments : On parle de « cannibalisme ». L'ADN libéré lors de la mort programmé de certain micro-organisme du biofilm aurait un rôle structural dans la stabilité des biofilms (**Bury-Moné, 2007**).

#### **4. facteurs favorisent la formation d'un biofilm :**

##### **4.1 Caractéristique de la surface :**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par micro colonie est importante car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée.

Néanmoins, certains souches sauvages des bactéries colonisent aussi des surfaces lisses **(Donlan ,2002 ; Dolan et Costerton ,2002).**

Les propriétés physicochimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur : d'une part l'hydrophobicité, les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux et d'autre par la présence d'un fit protéique **(Donlan, 2002 ; Hull Stodlay, 2002).**

##### **4.2 Caractères du milieu :**

On peut citer les facteurs suivants : température, PH, concentration en oxygène, concentration en fer, Osmolarité, présence d'ions spécifiques, source de carbone disponible, concentration en nutriment **(Martinez et Casa de valle ,2007 ; Spormaun ,2008).**

##### **4.3 Propriétés des cellules :**

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae, de flagelle, de curli, la production d'exopolysaccharide et certains protéines influencent l'attachement des bactéries sur une surface **(Liu et Tay, 2002 ; Palmer et al ,2007 ; Goller et Romeo ,2008).**

#### **5. Composition de biofilm :**

Concernant plus précisément les compartiments purement biologiques (biofilm basale est de surface). Un biofilm est principalement constitués des microorganismes pris dans une matrice de substance polymérique extracellulaire EPS sécrétées par dits microorganisme, sa composition globale est détaillé dans le tableau 1-1.

Les biofilms sont essentiellement constitués d'eau. Les microorganismes, qu'ils soient protozoaires ou métazoaires et la matrice d'EPS représentent que quelques pourcents de la masse totale, Néanmoins, la matrice seule peut représenter jusqu'à 50 à 90 % de carbone organique totale de biofilm **(Bakke et al ,1984).**

Les EPS qui composent la matrice sont déterminantes pour l'acquisition de la structure morphologique. Elles confèrent notamment aux biofilms leur densité et leur force de cohésion interne et donc leur résistance au phénomène de détachement, leur composition et très variables, puis quelle dépend des microorganismes, qui les produisent mais aussi des

signaux environnementaux qui vent générer, des métabolismes et des communications intercellulaires qui influencent leur synthèse (Lui et Tay ,2002 ; Stodlay et al, 2002).

**Tableau 1-1** : composition globale de biofilm ( Lui et Tay , 2002) .

Composé		Fraction	
Eau		87 à 99 %	
Bactéries		1 à 2 %	
	Polysaccharide		40 à 95 %
EPS	Protéines	2 à 5 %	< 1 à 60 %
	Acide nucléique		< 1 à 10 %
	Lipides		< 1 à 40 %

### 5.1 - Polysaccharide :

Les différents polysaccharides que l'on retrouve dans la MEC sont nombreux et capable de fournir plusieurs avantages aux cellules de biofilm, beaucoup de ses polysaccharides certains sont neutres ou polyamoniqes ce sont des homos ou hétéros polymères composés d'une longue chaîne carbone à motifs répétés allant de 0.5 à 2.0 \*10<sup>6</sup> Da. Nous pouvons différencier trois principaux avantages fournis par polysaccharide , le première étant de favoriser l'adhésion au sens général en jouent le rôle de « glue » que ce soit leur de la phase d'attachement initial des cellules , ou bien par la formation d'un hydrogel stabilisant les interactions cellulaires dans le biofilm , ou bien lors de la phase de détachement durant laquelle la désorganisation de ces polysaccharides permet de libérer des cellules dans l'environnement pour former un biofilm plus loin , chez la plupart des espèces bactériennes étudiées les polysaccharides des permettent l'adhésion comportent le même homopolymère (  $\beta$  -1-6 -2 amino-2-désoxy -d-glucoopyranosyl ) présenté sur la figure -1- , avec des degrés de N-acétylation -O- scintillation et de poids moléculaires variables .

La deuxième avantage induit par les polysaccharides consiste en la protection contre les menaces extérieures , En effet , les fibres polymériques formant un maillage tridimensionnel , la diffusion des antibiotiques est altérée voire complètement stoppé pour certains , D'autre part , les polysaccharides permettent de diminuer la détectabilité des organismes de biofilm par le système immunitaire mais également altèrent le phénomène de phagocytose ainsi que l'action du système du complément de l'hôte , En fin par leur propriétés humectantes , les polysaccharides permettent de retenir de grand Quantité d'eau protégeant ainsi la communauté cellulaire de la dessiccation.

## 5.2 Les protéines ;

Elles sont constamment produites et dégradé en réponse aux changements des conditions dans le biofilm, dans le MEC, nous retrouvons des protéines sécrétés par les cellules, des protéines qui sont issues de la lyse cellulaire, mais aussi des protéines associées aux membranes de vésicules de sécrétion, ces protéines peuvent revêtir de multiple rôle :

Ce peut être des enzymes , capable d'assimiler de nutriment qui sont parfois considérées comme un système digestif extracellulaire commun à plusieurs cellules voisines , si les substrats de ces enzymes sont des fibres de collagène ou d'élastique , alors ces enzymes peuvent jouer le rôle de facteur de virulence en induisant une digestif des tissus de l'hôte associées à une réaction inflammatoire.

Une autre propriété des protéines et la possibilité de formation des liaisons électrostatiques de certains polymères de la MEC, augmentant ainsi la robustesse de fibre. Ce qui induit une résistance à la digestion enzymatique, à la dessiccation et à la dénaturation thermique.

Ces phénomènes ont été observés entre autre chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans certains biofilms, les protéines peuvent également s'agglomérer pour former des fibres amyloïdes insolubles et hautement résistantes aux protéases.

En fin, les protéines peuvent entrer en jeu lors de communication intercellulaire, notamment dans des phénomènes de « QS » qui nécessite la libération de signaux chimique, certains pouvant être peptidique. La communication peut également se dérouler à l'aide de signaux électrique, où des électrons peuvent circuler dans la MEC via des pilis formant des nanos filaments protéiques capables d'assurer leur transport.

## 5.3 ADN extracellulaire :

L'ADN extracellulaire composent important de la phatogenisie des biofilms a d'abord été mis en évidence chez *P. aeruginosa* , *S.internedius* , *S .mutants* puis chez *E. faecalis* et le genre *Staphylococcus* , cet ADN extracellulaire est principalement issu de l'auto lyse des cellules du biofilm , mais peut également provenir de la lyse cellulaire lors des phénomènes de compétition , de façon surprenante , la présence d'ADN extracellulaire a été mise en évidence dans un jaune biofilm de *E.foecalis* ( -4h post inoculation ), qui ne peut avoir pour origine la lyse cellulaire , une fois dans la MEC , l'ADN peut être capté par les cellules environnants .

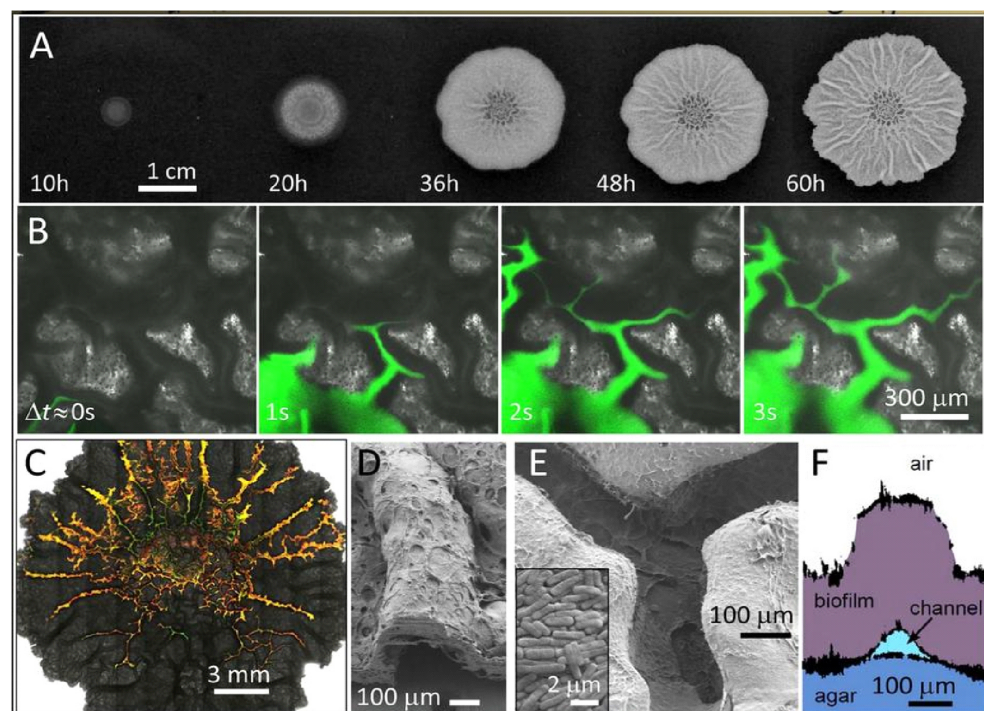
Un système enzymatique de recyclage composé de désoxyribonucléase peut alors mettre à profit cette source de phosphore, carbone et énergie tel qu'il a pu être observé chez *P.aerugénosa*.

En revanche, L'ADN peut être capté tel quel sous forme de plasmide par les cellules voisines, ceci afin de récupérer l'information génétique à l'origine des transferts horizontaux de gène, cette acquisition d'information génétique est responsable entre autre de l'acquisition de certain antibioresistance par des espèces auparavant sensibles.

En fin l'ADN extracellulaire peut être impliqué dans l'intégrité de la structure du biofilm, en effet l'ADN étant chargé négativement des liaisons électrostatiques peuvent avec des polymères cationiques ce qui renforce positivement le maillage de MEC.

#### 5.4 Les canaux :

L'observation par microscopie électronique des biofilms permis de mettre en évidence la présence de canaux entre les cellules, formant un véritable réseau capable de maintenir un flux continu de nutriments jusqu'au centre du biofilm, ces canaux servent aussi pour l'élimination des déchets. Des particules de plusieurs micromètres de diamètres peuvent être transportées ainsi



**Figure 03** : caractérisation des canaux d'un biofilm de *Bacillus subtilis* ( Dupin Alan , 2017).

**Sur l'encadré A de figure** : nous pouvons observer la croissance d'un biofilm *Bacillus subtilis* sur un gel d'agar contenant de l'eau et de nutriment .lors que le biofilm effectue sa maturation (plusieurs containers de micromètres d'épaisseur et plusieurs centimètres de diamètres) il forme des rides qui sont à l'origine de la formation des canaux.



**Sur l'encadré B :** nous montre une série d'image en microscopie dans une région proche du centre au moment de d'injection d'un colorant aqueux et plusieurs secondes après l'injection mettent en évidence le réseau de canaux.

**L'encadré C :** nous montre de façon similaire, une vision depuis le dessus du biofilm après injection du colorant.

**L'encadré D ;** permet d'observer une coupe transversale d'un canal.

Lorsque dans l'encadré E ; nous pouvons visualiser la même image vue dessous en fin une représentation transversale d'un parie de biofilm est schématiser en F.

En plus de toutes les fonctions vues précédemment, la MEC permet de capturer de façon plus efficiente les ressources nutritives présentes hors du biofilm par rapport aux cellules planctoniques. Les ressources peuvent provenir de la phase aqueuse surnageant le biofilm, ou bien de la surface colonisée par celui-ci si elle est biodégradable. Les substances polymériques extracellulaires agissent de façon passive telle une éponge en absorbant et adsorbant les nutriments gaz et autre molécules via des mécanismes d'échanges anioniques et cationiques non spécifiques, ce qui permet aux biofilms de croitre dans des milieux très appauvris en nutriment.

La rétention de composé n'est pas spécifique, ce qui veut dire que l'on retrouve un nombre conséquent et varié de molécules qui s'accumulent dans le biofilm. Non seulement des nutriments, mais aussi des toxiques et même de façon surprennent des composés fortement hydrophobes (benzène, xylène, toluène). Si ces substance ne sont pas dégradées, elles sont libérées ultérieurement vers la phase aqueuse si le gradient de concentration y est favorable ainsi les biofilms peuvent se comporter à la fois comme des obouers mais aussi comme des sources de contaminants.

La production de la MEC c'est donc un processus dynamique qui dépend des nombreux facteurs, cependant sa production implique un cout énergétique important pour les communautés microbiennes et si l'évolution a conservé le phénomène c'est que l'intérêt de la MEC est essentiel pour les formations de biofilm.

### **- 5.5 Les Lipides :**

Les lipides sont retrouvés en faible quantité dans la MEC par rapport aux autres composants de l'ordre de 1 %, leur composition et leur rôle précis ont été jusqu'à présent peu étudiée, nous pouvons tout de même retrouver des familles de lipides, tel que des phospholipides des glycolipides ou des lipides dit neutres sans propriétés tensioactives.

Le taux des phospholipides et sphingolipides par gramme de biomasse est supérieure dans la forme sessile par rapport la forme planctonique, d'autre part, la proportion de lipide

aient un rôle durant la première étape de formation du biofilm en favorisant l'adhésion sur des surfaces hydrophobes.

En 1969, en utilisant la microscopie électronique ces chercheurs ont confirmés, outre la structure des biofilms, l'existence d'une matrice polysidique autour des agrégats microbiens dans les filtres des stations dépurations (**Wagner et al, 2010**).

En 1973, en utilisant le microscope électronique Charaklis a démontré la ténacité et la résistance des dépôts microbiens dans les conduites d'eau industrielles (**Wagner et al ,2010**).

En 1978, John luilian Costerton après constituées des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire Costerton propose alors le terme de « biofilm » pour définir ces communautés microbiennes (**Boudine, 2017**) l'étude de ces structures biologiques complexes et devenue un champ pluridisciplinaire qui intéresse des nombreux chercheurs (**Sauer et al, 2007 ; Kon, 2012**).

Depuis, l'intérêt pour la recherche scientifique sur les biofilms croit de manière exponentielle, et qui a vraiment débuté qu'à partir des années 2000, avec la réalisation des premières images CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy). De biofilm vivant par Laurence et al cependant, il Ya encore un manque de connaissance général sur la façon dont les biofilms se développement changent et se détachent (**Sauer et al ,2007 ; Karuna Karan et al ,2011 ; baddi ou bekka ,2012 ; Kone 2012**

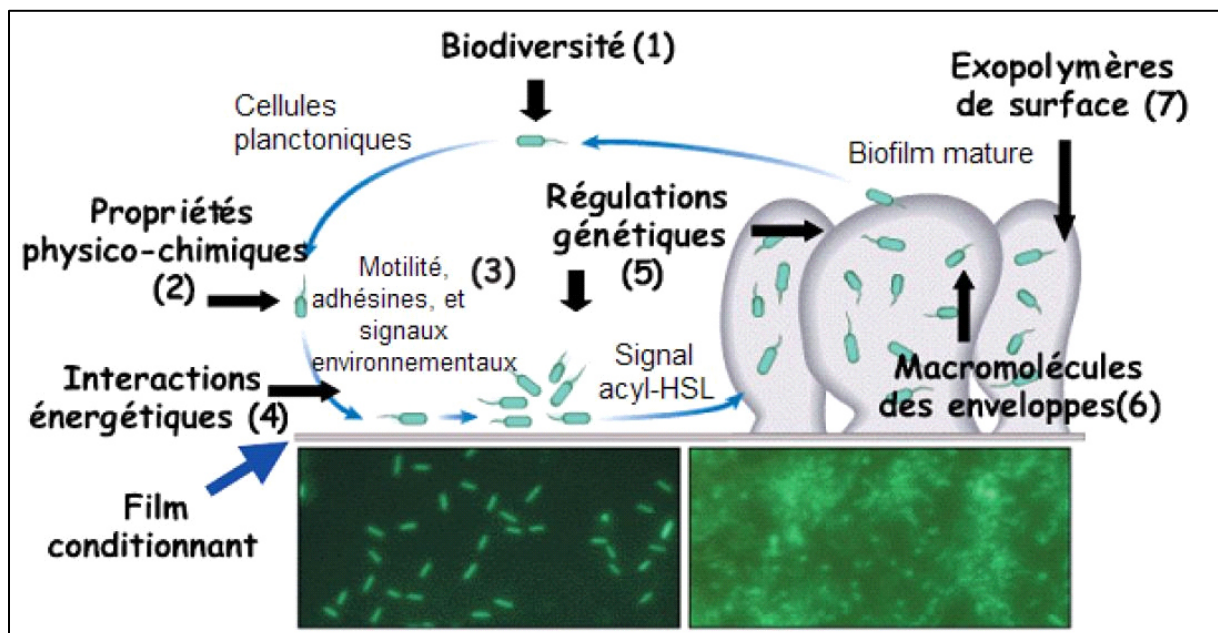


Figure 04 : composition de biofilms (Kone, 2012)



## 6. Mise en place d'un biofilm :

La formation d'un biofilm microbien dépend de plusieurs facteurs à savoir, le nombre des cellules présentes, la vitesse du flux du liquide dans lequel se trouvent le dispositif et les propriétés physico-chimiques de la surface (Donlan, 2001).

Ce phénomène extrêmement complexe, nécessite plusieurs étapes et se déroule selon une séquence bien établie (Botto, 2003) ; (Haras, 2005), (Figure N°5).

Sur une période de 24 à 48 heures, les micro-organismes adhèrent aux surfaces, par une association réversible et irréversible, suivie par une accumulation de microcolonie, puis la formation d'un biofilm mature très structurés et interactifs (O'toole, 2003) ; (Ramage et al, 2005) ; (Li et al, 2007).

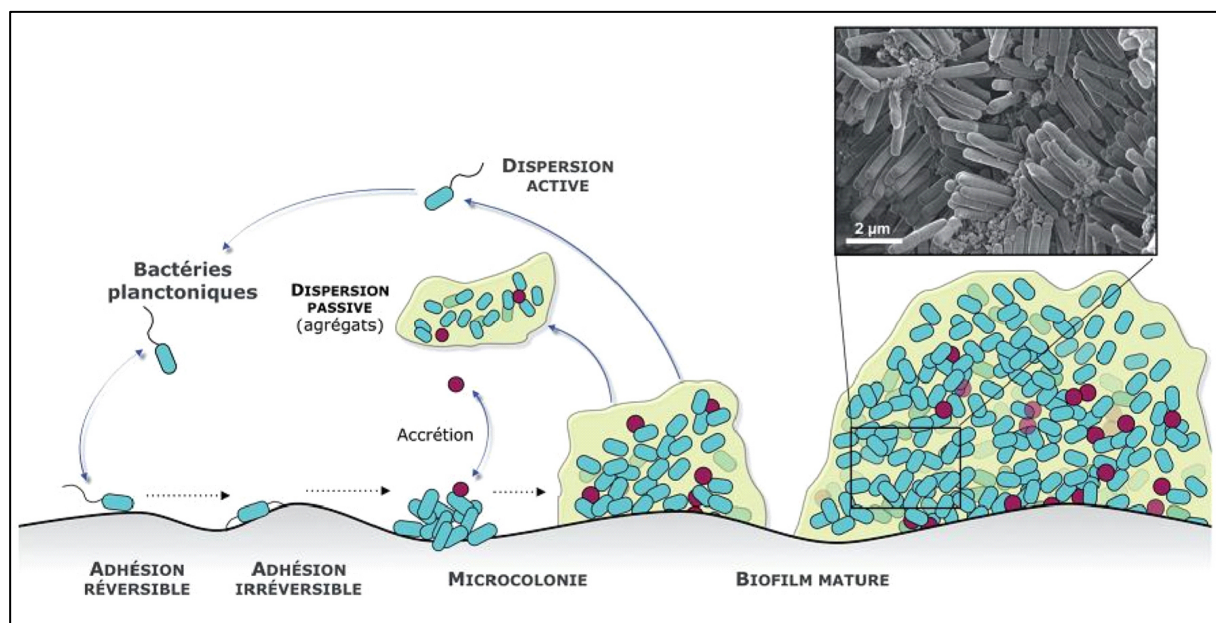


Figure 05 : cycle de vie des biofilms (Tremblay et al, 2014).

### 6.1 Adhésions réversibles :

La formation d'un biofilm débute par l'adhésion d'une ou plusieurs cellules à une surface, celle-ci peut être de nature très variés abiotiques (élément minérale se sol ou d'un milieu aqueux, voire un cathéter ou une prothèse) ou milieu biotique (muqueuse intestinale ou vaisseau sanguin)

Les biofilms développent en milieu liquide ou exposé à l'humidité les bactéries planctoniques s'approchent, d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelle), possède un avantage compétitif en ayant la possibilité de surmonter les forces hydrodynamiques grâce à leur flagelle.

Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le PH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriment.

L'adhésion des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité, les bactéries adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse hydrophobe et non polaire.

### **6.2 Adhésion irréversible :**

C'est un phénomène actif et spécifique qu'est médié par les organelles filamenteuses appendues aux microorganismes (fimbriae ou pilis interagissant avec la structure moléculaire à la surface de cellule, la fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharide par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérences variables selon les espèces bactériennes.

Chez *E. coli* cette fonction est supportée par les pilis de type 1 qui possèdent à leur apex une adhésion fine H qui a toute son importance dans la colonisation du tractus urogénital lors d'infection urinaire par exemple.

Chez *P. aeruginosa* l'adhésion irréversible repose principalement sur les pilis de type 4, à partir de cet instant une action mécanique ou chimique est nécessaire pour rompre l'adhésion des cellules, cette étape d'attachement irréversible est présentée sur la figure 5. Elle survient généralement 3 à 4 heures après l'étape initiale.

### **6.3 Accumulation des microcolonies :**

La bactérie fonde une microcolonie qui produit une matrice extracellulaire et qui peut accueillir d'autres espèces bactériennes par accréation, les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'exopolysaccharide EPS et être utilisé par les bactéries (**Filloux et Vallet, 2003**).

La formation des agrégats de microcolonie génère des interactions significatives telles que l'échange des substrats, produits, inhibiteurs, déploiements des molécules de signaux entre eux, la densité cellulaire, la taille et la géométrie de l'agrégat et son activité métabolique conduisent à des barrières de diffusion, qui peuvent être minimales ou suffisamment provoquer des changements importants en biologie le plus souvent, en raison de sa faible solubilité dans l'eau et d'un taux élevé d'utilisation par les bactéries un fort gradient de tension en oxygène se développe ce qui peut conduire à des régions anoxiques et à la prolifération d'espèces anaérobies (**Allison et al, 2000**).

**6.4 Maturation de biofilm :**

La sécrétion des molécules des grandes tailles par les bactéries adhérentes, se réalisent soit par des mécanismes de sécrétion active soit par lyse cellulaire.

Le biofilm acquière une structure tridimensionnelle multicouche avec la présence de cellule qui se multiplient de façon exponentielle pour former des colonies en son sein, l'arrangement tridimensionnel conduit également à l'apparition des canaux aqueux facilitant l'apport de source carbonée, dioxygène et l'élimination des déchets.

La multiplication des cellules fixées entraîne une augmentation de la biomasse bactérienne et de la synthèse d'exopolymère nécessaire pour former la matrice de biofilm, la matrice présente dans tous les biofilms n'a pas qu'un rôle d'échafaudage maintenant la forme du biofilm, elle apporte une contribution significative à l'intégrité structurel et à la tolérance général des biofilms aux facteurs environnementaux et aux antimicrobiens.

La matrice peut être biologiquement active et conserver l'eau, les nutriments et les enzymes dans le biofilm.

Les caractéristiques chimiques de la matrice peuvent induire l'exclusion ou limiter la pénétration d'autre molécule, y compris certains agents antimicrobiens chargés (**March ,2011**).

La proximité des cellules dans un biofilm permet des nombreuses interactions synergiques et antagonistes entre espèce voisine, et le développement des chaînes alimentaires et des réseaux alimentaires. (**Kuramitsu et al ,2007**).

**6.5 Détachement et dispersion :**

Lorsque de biofilm est mûré, certains cellules peuvent se détacher pour retourner sous leur forme planctonique. Le détachement de certaines cellule du biofilm à distance sous repose par les cellules elles même via plusieurs mécanismes : la dégradation enzymatique de la MEC, la dissolution des adhésions par des protéases, nucléase mais aussi via des phénomènes médiés par le Qs.

La dispersion est considérée comme double : dispersion active et dispersion passive.

La dispersion active ; est initiée par les bactéries même du biofilm afin de s'échapper de celui-ci il s'agit donc d'une dispersion biologique (**Morgan et al ,2006 ; Baudin ,2017**).

La dispersion passive est quant à elle relayée par des forces externes appliquées au biofilm qui décrochent les bactéries du biofilm. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanisme physicochimique (**Davies, 2011 ; Mc Dougold et al, 2012**).

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques des bactéries du biofilms, comme l'antibiorésistance, en effet les bactéries planctoniques essaient d'un biofilm

sont capable de résister à la défense immunitaire d'un hôte et être à l'origine d'une infection (Dolan et Costerton ,2002).

## 7. Les mécanismes régulateurs de la formation de biofilm :

### 7.1 Quorum sensing(QS) :

#### 7.1.1 Définition et mécanisme ;

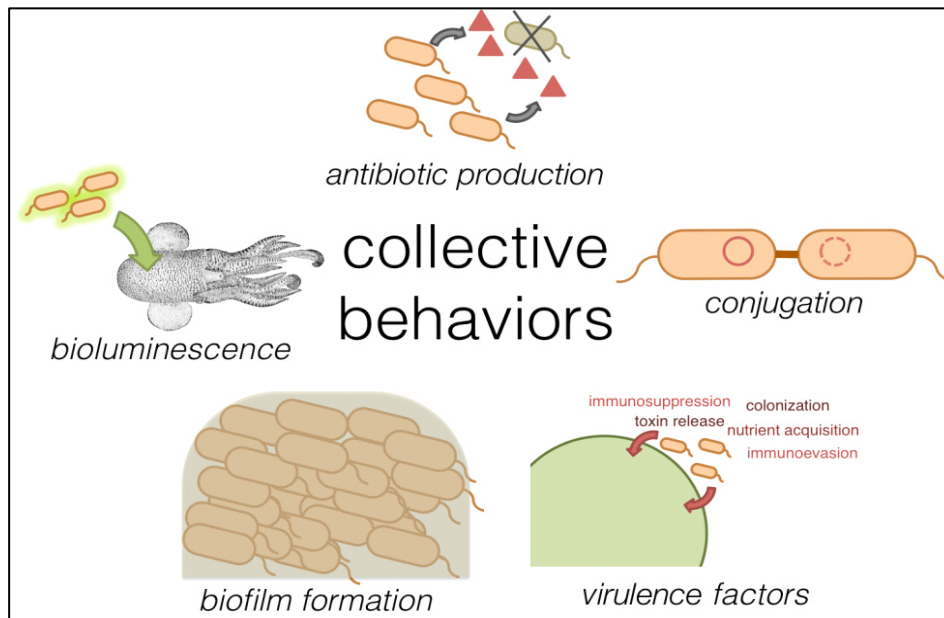
Les bactéries peuvent afficher une réponse collective à l'environnement et démontrer le même comportement, ce qui est indicatif de la communication entre les individus de la population (Riedel et al, 2007).

L'utilisation des antibiotiques exerce une pression de sélection sur les agents pathogènes favorisant ainsi l'émergence d'espèce multi résistante, le manque des nouvelles molécules pousse la recherche dans d'autre direction, sur le Qs par exemple ; le Qs correspond à un des processus de communication intercellulaires.

Ce phénomène a d'abord été mise en évidence chez une bactérie marine bioluminescente dénommée *Aliivibrio fischer*, cette bactéries est symbiotique d'*Eupymna scolope*, un petit calamar de l'océan pacifique centrale cette dernière permet d'émettre une bioluminescence à l'intérieure du corps du céphalopode, qui le protège des prédateurs. Situé dans les eaux profondes en évitant de créer une ombre à la surface de l'eau, la luminescence provient de photon émis par la luciférine lorsqu'elle retourne à un état stable après avoir été excité par oxydation via la luciférase en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et de dioxygène.

Donc le Qs comme étant un processus de communication intercellulaire qui permet aux espèces bactériennes ou fongiques de modifier de façon collective et coordonnée leur comportement en réponse à leur nombre dans le milieu , ce processus nécessite quatre étapes successives , tout d'abord la production des petites molécules chimiques appelée auto-inducteurs , puis une étape sécrétion extracellulaire , suivie de leur liaison à leurs récepteurs respectifs qui entraînent de dernier lieu une modifications du niveau d'expression d'un ou plusieurs gènes , les gènes et fonctions contrôlés par le Qs peuvent être classés en quatre catégories fonctionnelles : la maintenance et prolifération cellulaire ( Via la production de sédirophores , l'exo enzyme , de sporulation ), le transfert horizontal de gène ( par transformation de cellules dites compétentes , par conjugaison ). le comportement cellulaire ( adhésion formation de biofilm et dis pression , motilité ....) , et les interactions avec les autres microorganismes ou l'hôte ( production d'exopolysaccharide , des facteurs de

virulences , d'antibiotiques , de bioluminescence à , certains de ces comportements médiés par le Qs sont représentés sur le figure 06 ;



**Figure 06** : schématisation des comportements contrôlés par le Qs (Dulin Alban ; 2017).

Le Qs en plus d'être un processus de synchronisation d'expression génique concentration dépendant, peut également être décrit comme un moyen pour les cellules d'explorer l'environnement. cette autre théorie connue sous le nom de « diffusing sensing » perception de la diffusion propose que les cellules, via la production d'auto-inducteurs sont capable de percevoir la densité cellulaire , la distribution spatiale ainsi que la limitation de la diffusion des auto-inducteurs , et que selon les résultats obtenus , les cellules décident ou non de produire des molécules plus coûteuses en énergie , en tout état de cause , il est clair que cette théorie ne doit pas être opposé au Qs , mais doit être considérée comme complémentaire .

Les auto-inducteurs utilisés sont variées les molécules employées sont plus ou moins propres à certains règnes, genre voire espèce.

### 7.1.2 Les molécules de Qs ;

**Chez les bactéries gramme négatives ;** cette communication est le fait d'une petite molécule soluble diffusible ou molécule signal et d'une protéine de régulation de la transcription appelée protéine R la majorité des molécules signaux sont de N-acyl L-homosérine lactone (HSL) qui s'accumulent dans le milieu avec la croissance bactérienne et

se fixent à la surface de la cellule sur un récepteur de la protéine R qu'il active pour la transcription de gène qui diminue la mobilité, induisent des modifications de phénotypes cellulaires à l'origine de la formation du biofilm.

**Chez les bactéries grammes positives ;** cette communication est le fait de trois composants moléculaires ;

- Un peptide signal.
- Un ligand membranaire (Histidine, kinase HK).
- Une molécule régulatrice de la réponse intracellulaire RR.

Les molécules peptidiques signals interagissent avec les histidines –kinases HK protéine par des récepteurs membranaires pour une transduction du signal transmembranaire grâce aux molécules régulatrices intracellulaires RR. Par exemple *Streptococcus* mutants à l'origine de processus carieux, le peptide signal de 21 acides aminés appelé CSP (Compétence Stimulating peptide) active à partir d'une valeur seuil, la RR, ces molécules RR enciènches la transcription des gènes pour la formation du biofilm.

### 7.1.3 Le rôle de QS :

Le Quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, et en prenant en compte les conditions environnementales, il unit les phénomènes de dispersion et d'essaimage de bactérie planctonique à partir du biofilm (Irie, 2008), le Qs aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm (Clutterbuck, 2007), il peut réprimer ou stimuler l'expression de certain caractère, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaire, comme les protéases (Clutterbuck, 2007); (Irie, 2008). Le Qs jouerait un rôle dans l'établissement d'antibioresistance, mais cette hypothèse reste controversée, les molécules du Qs jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires (exemple de *Serratia marcescens*) (Queck, 2006).

Les synergies observées au sein des biofilms constitués des différentes espèces de micro-organismes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le Qs (Bjarnsholt, 2005), les biofilms composés de plusieurs communautés de bactérie d'espèce différentes ont de forte concentration en molécule de Qs compte-tenu de la densité élevée des cellules présentes.

### 7.1.4 Altération du Qs conséquence :

L'altération des mécanismes de Qs peut aboutir à l'importantes modifications phénotypiques des microorganismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou en cours des anomalies dans le cycle de



développement du biofilm , surtout lors des étapes de formation et de dispersion ( **Irie , 2008** ) .les biofilms mutants pour les molécules du Qs ont une structure tridimensionnelle déficiente , par exemples les mutants de Burkholderia cenocepacia pour les molécules du Qs sont toujours capable de se fixer à une surface mais l'organisation spatiale des cellules est altérée de façon drastique ; de plus on constate une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques de ces bactéries pendant la phase de croissance du biofilm ( **Tomlin, 2005** ) des biofilms de Pseudomonas aeruginosa mutantes pour les molécules du Qs sont moins résistante à l'action de la tombramycine , du peroxyde d'hydrogène et des macrophages ( **Bormolla ,2006** ) .

## **7.2 Régulation génétique par les cellules fixées :**

Après fixation sur un substrat, l'expression d'un certain nombre des gènes est régulée par les cellules fixées. Cette régulation peut être de type inhibiteur ou stimulateur. Elle va entraîner une modification phénotypique des bactéries et avoir pour conséquence la formation d'un biofilm , Au cours de la formation d'un biofilm , 22 % des gènes sont stimulés et l'expression de 16 % des gènes est inhibée , lors de la formation de biofilm de staphylococcus aureus , des gènes codant pour des enzymes intervenant dans la formation et la glycolyse ( phosphoglycérate mutase , triosephosphate isomérase alcool déshydrogénase ) , sont stimulés , ceci peut être relié au fait que la concentration d'oxygène dans le biofilm diminue au fur et à mesure de son développement .

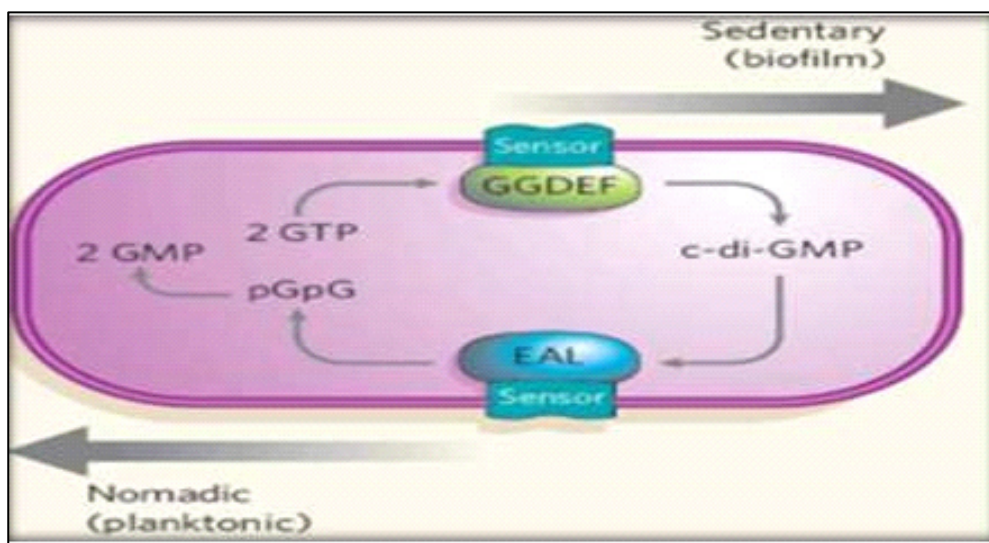
## **7.3 Les autres mécanismes régulateurs de la formation du biofilms comme les polysaccharides, le GPM-c et par l'acétyl phosphate et l'alarmone ;**

Les polysaccharides présents à la surface des cellules jouent un rôle important dans les interactions entre les bactéries et leur environnement immédiat, par exemple, on trouve à la surface d'Escherichia coli l'antigène de lipopolysaccharide O (LPS) et l'antigène polysaccharidique de capsule K. Les polysaccharides, appelés aussi endotoxine font partie de la paroi des bactéries de G<sup>-</sup>.

Ils peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilm selon les cas, les polysaccharides des capsules sont des facteurs de virulences ; ils protègent les bactéries des défenses immunitaires de l'hôte (phagocytose et activation du complément). Trois polymères synthétisés par E. coli se faisant partie de la matrice ont un rôle important dans la formation d'un biofilm et dans l'expression de facteur de virulence, il s'agit de la cellulose de l'acide colanique (polymère chargé composé de glucose , galactose, fructose et acide glucuronique ) , et de PGA ( la synthèse d'acide colanique peut être induite par des concentrations d'antibiotiques de la famille de proche de concentration létales ; l'acide colanique forme une

capsule il en résulte une exacerbation de la formation et de la persistance d'un biofilm face à des agents antimicrobiens .

Le C-di-GMP est un régulateur central du mode de vie sous forme de biofilm de l'expression de facteur de virulence , le C-di-GMP est un seconde messenger , intervenant dans des cascades de phosphorylation et modulant d'expression des certains gènes des bactéries du biofilm , impliqués dans les mécanismes de formation du biofilm et dans l'expression de la virulence , la transformation de GTP en GMP-c par la diguanylate cyclase est activée par des signaux extracellulaires , différents selon les bactéries concernées , lorsque la quantité de GMP-c augmente au sein de la cellule la quantité de protéine jouant un rôle de facteur de virulence augmente .



**Figure 07** : schéma représentant le changement de mode de vie de la bactérie en fonction de la concentration intracellulaire en c-di-GMP (Bezoui mouna, 2016).

Une concentration intracellulaire élevée en c-di-GMP favorise une existence sédentaire tandis que des faibles concentrations favorisant un mode de vie planctonique, ces protéines pourraient constituer de nouvelle cible pour des molécules antimicrobiens.

Récemment, des petites molécules intervenant dans la régulation de la formation d'un biofilm selon les conditions nutritionnelles du milieu ont été identifiées, il s'agit de l'acétylphosphate et de l'armonie l'acétylphosphate s'accumule dans le milieu intracellulaire lorsque la concentration en source carbonée augmente et / ou lorsque la concentration en oxygène est basse l'alarmone est une molécule signal intracellulaire qui s'accumule lorsque les concentrations en nutriments sont très basses , elle induit une cascade enzymatique aboutissant à la régulation de l'expression de gène codant pur de fimbriae de type I , l'action de cette molécule va permettre d'augmenter la probabilité de survie des bactéries dans des



milieux stressants . Le mode de vie sous forme de biofilm protège les microorganismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages.

## **8. Infection aux biofilms :**

Les premières descriptions d'infections liées aux biofilms sont associées à la contamination de matériel implanté. En 1982 un article rapportant le cas d'un patient porteur d'un stimulateur cardiaque ayant présenté trois épisodes de bactériémie à *S.aureus*. L'analyse en microscopie électronique du stimulateur cardiaque après son ablation mise en évidence, pour la première fois, l'implication d'un biofilm dans la pathogénie d'une infection sur matériel. Environ cinq millions d'implants et prothèses sont utilisés tous les ans aux États-Unis et du fait du vieillissement de la population, le nombre de patients concernés par le recours à ce type de dispositif augmente. Tous les matériaux implantés sont exposés à ce risque. Outre le développement de biofilm sur les cathéters vasculaires ou urinaires, sondes orotrachéales, les infections liées aux biofilms touchent également les implants orthopédiques (prothèse articulaires ou matériels d'ostéosynthèse), et sur les 2,6 millions d'implants orthopédiques posés annuellement aux États-Unis, environ 112000 (4,3%) seront contaminés.

Le risque de colonisation n'est jamais nul du fait de possible contamination par voie hématogène ou par contact avec l'environnement extérieur pour les dispositifs à émergence cutanée (Sond urinaire ou cathéters), les biofilms une fois formés constituent des réservoirs bactériens à l'origine d'infections liées aux soins.

### **8.1 Infection chronique :**

Plusieurs infections chroniques caractérisées par leur difficulté thérapeutique, l'impossibilité de stériliser certains foyers d'infection et un risque élevé de récurrence sont également considérées comme des infections liées aux biofilms. Certains exemples illustrent ces caractéristiques ;

#### **8.1.1 L'endocardite infectieuse :**

Elle correspond au développement d'un biofilm localisé aux valves cardiaques, l'utilisation du modèle d'endocardites du lapin montre qu'après l'adhérence de streptococcus sanguis sur un thrombus valvulaire, des microcolonies entourées d'une matrice composée d'éléments bactériens et de l'hôte (fibrine, plaquette) produisent des végétations qui protègent les bactéries des leucocytes, le traitement de cette infection nécessite une antibiothérapie prolongée et un recours fréquent à la chirurgie.

**8.1.2 La mucoviscidose :**

C'est une maladie génétique autosomique récessive touchent environ 35000 enfants et jeunes adultes en Europe. La dégradation de la fonction respiratoire est liée à la production d'un mucus épais et abondant qui ralentit la clairance mucociliaire et favorise la colonisation bactérienne, la colonisation et les épisodes infectieux sont fréquents polymicrobiens et les principales bactéries impliquées sont *S.aureus* et *H.influenza* dans l'enfance puis dans un second temps *P. aeruginosa*. La présence d'agrégats de bactérie au sein d'une matrice extracellulaire dans leur physiologie et les difficultés thérapeutiques rencontrés dans le traitement de ces infections indiquent la présence d'un développement bactérien de type biofilm bien documenté dans le cas de *P.aeruginosa*.

**8.1.3 Infection urinaire récidivantes :**

Classiquement attribuée à de multiples épisodes de néocolonisation depuis le tractus digestif, des travaux récents réalisés dans un modèle murin mettent en évidence que des souches d'*E.coli* uropathogène sont capables de coloniser les cellules de l'épithélium vésicale et de former de larges agrégats intracellulaires entourés d'une matrice correspondant à un biofilm qui constituerait le réservoir des bactéries pathogènes entre chaque épisode infectieux (cystites, pyéloné, phrite).

**8.1.4 Infections associées aux plaies chroniques :**

On estime que 1 à 2 % de la population des pays développés souffrent de plaies chroniques comme les ulcères des membres inférieurs ou les complications cutanées liées aux diabètes, soixante pour cent d'entre elles (contre 6% des plaies aiguës) sont colonisées par des bactéries ou des champignons sous forme de biofilms polymicrobiens tolérants aux antibiotiques qui ralentissent ou empêchent la cicatrisation et favorisent un état d'inflammation chronique.

**8.1.5 Pathologie buccodentaires et oto-rhino-laryngologie :**

Il a été démontré grâce à des prélèvements cliniques et modèles *in vivo*, que les bactéries responsables d'otites moyennes chroniques (*Haemophilis influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhatis*), forment des structures typiques des biofilms, cette observation a permis de comprendre en partie les difficultés thérapeutiques rencontrées dans ces situations cliniques et la nécessité fréquente d'une prise en charge chirurgicale. Les infections buccodentaires (carie ou stomate) impliquent également le développement d'un biofilm qui est dans ce cas fréquemment polymicrobiens la colonisation par une première

espèce permet alors le développement d'un échafaudage des macromolécules favorisent l'adhérence d'autre espèce .

Ces complications concernent donc des nombreux patients dans des contextes des soins très variés, plusieurs approches thérapeutiques sont actuellement utilisées afin de prévenir le développement des biofilms ou d'essayer de les éradiquer.

## **9. Résistances et tolérances aux antibiotiques :**

### **9.1 Résistances de biofilm aux antibiotiques :**

La communauté scientifique s'est orientée vers un premier coupable pour expliquer l'hyper résistance en biofilm : la matrice et son rôle de barrière à la diffusion vis- à-vis des antimicrobiens appliqués c'était le plus évident.

En quelques années de recherche, il est vite apparu que ce phénomène ne pouvant, la lui seule expliqué l'ensemble des observations expérimentale. les recherches s'intensifient alors dans l'autres directions , on pense que les bactéries en biofilm peuvent avoir une physiologie spécifique , un métabolisme ralention imagine que la densité et la proximité spatiale des cellules dans un biofilm favorise l'échange de gène entre cellule, et l'apparition des mutants résistantes les travaux les plus récents mettent en avant l'hétérogénéité du biofilm, et des types cellulaires comme un facteur essentiel à la survie de la communauté , mais finalement plus les connaissances avancent plus il apparait que les processus de résistance sont multiples , de plus dépendent étroitement du consortium microbienne et de mécanisme d'action de l'agent antimicrobien applique .

Des nombreux problèmes associés aux développements des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevé aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants).

Cette résistance accrue, multifactoriel, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité accès aux nutriments, oxygène etc.), elle modifie les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistances spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistances connus.

La résistance élevée des biofilms aux agents antibactériens pourra également reposer sur la présence d'une subpopulation des bactéries résistances, capables de résister à de forte concentration d'antibiotique (**Lowis, 2015**).

Ainsi alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre des nombreuses maladies infectieuses, celles qui sont liées à la présence de biofilm,

échappent largement à la présence des biofilms, échappement largement au type de traitement.

Les antibiotiques sont un effet très peu efficace contre les biofilms et les symptômes peuvent réapparaître une fois le traitement fini.

### 9.2 Tolérance aux antibiotiques :

La tolérance du biofilm aux agressions extérieures est ses caractéristiques les plus remarquables, par rapport à des bactéries cultivées en milieu liquide on observe une survie du biofilm bactériens à des doses d'antibiotiques allant jusqu'à 1000 fois la concentration minimale inhibitrice ( CMI) ainsi qu'une résistance élevée au ultraviolets , métaux lourds acides et aux changements d'hydratation et de salinité cependant , après remise en suspension du biofilm , les bactéries isolées en milieu liquide ( on parle alors des bactéries planctoniques).

Présentent une sensibilité in vitro normale aux antibiotiques, cette caractéristique est donc réversible phénotypique et non hérité on parle lors de tolérance du biofilm plutôt que de résistance (sur la différence entre ces deux phénomènes).

La tolérance correspond au fait que la croissance des bactéries est inhibés mais qu'un antibiotique bactéricide est incapable de tuer ces bactéries au de la d'un certain point, cette situation correspond aux biofilms qui sont capables de survivre à des concentrations très élevés des biocides. Cette caractéristique est phénotypique, c'est-à-dire qu'elle disparaît lorsque les bactéries composantes le biofilm sont remises en suspension en phase planctonique.

## 10. Les antibiotiques comme signaux activateurs de biofilm :

L'un des concepts majeurs de l'antibiothérapie et la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui se comme la concentration minimale d'antibiotiques permettant d'inhiber totalement la croissance bactérienne. Des doses sous la CMI ne sont pas létales mais sont capables d'affecter la croissance, la morphologie, les propriétés de surface, la pathogénicité et même la formation du biofilm chez différentes bactéries (**Davies et al ,2006 ; fonseca et souso, 2007 ; kaplan, 2011 ;Games peixoto et al, 2013 ; Andersson et hughes, 2014** ) .En effet plusieurs études ont démontré que des doses sous CMI de étaient capable d'induire la formation d'un biofilm incluant les biofilms d'Acinetobacter baumani ( **Nucleo et al, 2009** ) , P.aeruginosa (**Bagge et schuster et al, 2004**), S.aureus , Staphylococcus lugdunensis ( **frank et al, 2007** ) , et Streptococcus intermedius ( **Ahmed Petersen et al ,2009** ). les mécanismes associés à cette augmentation de biofilm varient selon la nature de

l'antibiotiques et l'espèce bactérienne affectée chez *S.intermedius* par exemple , l'exposition à des sous CMI l'ampicilline induit la formation du biofilm par l'intermédiaire de la molécule signal lux S et l'augmentation de la production des auto inducteurs de type 2 ( **Ahmed Petsern et al, 2009**) chez *Corynebactérium diphtériae* , il a été démontré que des doses sous –CMI de pénicilline induisent une hyperfilamentation et une augmentation de l'hydrophobicité de surface et par conséquent une hyperproduction de biofilm ( **Gomes peixoto et al ,2013**) certains antibiotiques tels que l'imipenème sont capable à des doses sous –CMI d'induire l'expression de gène codant pour la biosynthèse de l'alginate ( **Bagge schuster et al ,2004**) ce dernier est un important polysaccharids dans le biofilm de *P.aeruginosa* ( **Bagge schuster et al ,2004**) . De manière similaire Berdant et al, démontrèrent que l'exposition de *S.mutans* des doses sous la CMI de triclosan augmente l'expression des gènes *grfC* et *atLA* codant respectivement pour une glycotransférase est une protéine liant la fibronectine qui entraine une augmentation de l'adhésion aux cellules épithéliales et une plus grande production de biofilm (**Bedran et Grignon ,2014**) , l'exposition d'un biofilm de *S.aureus* à de faible dose de Induits la libération de l'ADN extracellulaire menant à de l'auto agrégation et l'augmentation du volume du biofilm (**Kaplan et Izano et al, 2012**) .

Les antibiotiques dans les élevage porcins sont prescrit pour un usage curatif , préventif et comme additif dans ce dernier cas , les antibiotiques peuvent être utilisés comme facteur de croissance , c'est le cas en Amérique du Nord dans la production animale (**CVMA ,2008 ; Gurdasassi et jensen et al ,2008 ;Marshall et levy, 2011 ; Burch ,2013 ;Thacker, 2013**) ,cette utilisation suscite cependant des certains quant à la dissémination et l'émergence des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques à leur conséquence pour la santé animale et humaine (**Van des fels-Klerx et Puister –jansan et al ,2011 ;Thacker, 2013**) , En tant que facteur de croissance , les antibiotiques sont ajoutés à de faible doses de la nourriture ) ou l'eau , ces concentrations sont bien indice à des celles requises dans les traitements thérapeutiques ce qui affecter le mode de vie des bactéries et promouvoir leur persistance et leur résiste aux antibiotiques par l'intermédiaire des biofilms

## 11. Empêchement aux systèmes immunitaire :

Le biofilm est souvent associée aux infections chroniques due à une meilleure habilité à échapper au système immunitaire de l'hôte et à une capacité accrue à persisté dans l'organisme (**Alrede et Bjarnshol, 2014 ; Roilides et Simitso poulou et al, 2015**), plusieurs études ont démontrés que les bactéries dans un biofilm sont capable d'éviter l'action des

cellules immunitaires par différents mécanismes (**Hanke et Kielian, 2012 ; Roilides et Simitso poulou ,2015**). En effet chez *S.aureus* , les bactéries sous formes de biofilm de résistant à la phagocytose par les macrophages (**Thurlor et Hanke et al, 2011**) , les composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle d'une barrière protectrice en empêchant l'opsonisation des bactéries à l'intérieures du biofilms , l'alginate ,par exemple , entant que composant principal du biofilm des souches *des* mucoides de *P.aeruginosa* .Offre une protection contre des leucocytes humaines ( **leid et Willson et al, 2005**), d'autre part , les cellules de biofilm de *S.épidermidis* en inhibant l'action du complément C3b (**Kristain et Birkenstock et al, 2008 ; Domenech et Ramos –sevillano et al, 2013**).

Dans une récente, Abukhweek et collaborateurs, Ont démontré que les souches de la pneumophila issues d'une culture en biofilm étaient capables de survivre plus long temps dans des macrophages murins alors que les bactéries planctoniques étaient, quant à elle, rapidement dégradées dans lysosomes des macrophages (**Abu Khweek et fernandez Davila et al, 2013**) , cette évasion à l'action des lysosomes serait liée au fait que les bactéries ayant été cultivées dans des conditions de biofilm seraient dépourvues des flagelles ces cellules du biofilm n'activent pas les cas passes 1et 7 et évitent ainsi le déclenchement de la voie lysosome de l'apoptose ( **Abukhweek et fernandez Davila et al , 2013**) . Dans cette même étude , les cellules de la pneumophila planctoniques induisaient une plus forte productions de l'IL-1par les macrophages comparés aux bactéries du biofilm (**Abu khweek et fernandez Davila et al , 2013**) .Cette dernier observation est soutenue par plusieurs autres études qui démontré que le biofilm est souvent associées à une faible réponse inflammatoire ( **Hank et kielian, 2012 ; Roilides et Simitsopoulou et al ,2015**) , Daw et al observé que l'exposition des macrophages à des cellules de *E.faecalis* cultivées en biofilm induisait une plus faible production de cytokines pro-inflammatoire comparée à celle faisant suite à une exposition à des bactéries planctoniques (**Daw et Baghdayen et al ,2012**) . de manière similaire, il a été démontré quelle biofilm de *streptococcus pneumoniae* activait moins les macrophages in vivo et par conséquent la réponse pro-inflammatoire était démunie( **Blanchette –cain et hinojosa et al, 2013**) , dans cette étude , les auteurs ont démontrés que les mutations abolissant le biofilm de *S.pneumoniae* permettaient d'augmenter significativement l'activation de macrophage et les taux de production des cytokines pro-inflammatoires IL-I (**blanchette-cain et Hinojosa et al ,2013**) .

## **12. Ubiquitaire de biofilm :**

Du fait de leur nature ubiquitaire, les biofilms peuvent être utiles voir même nécessaires comme ils peuvent être source problèmes, parfois ils se développent dans des endroits où leur présence n'est pas souhaitée et deviennent problématiques notamment dans le domaine médical, industriel ou dans l'environnement (**Beech et sumer, 2004 ; Dobretsov et al, 2009**).

### **12.1 Dans l'environnement :**

Les biofilms sont présent partout dans l'environnement, d'ailleurs 80% de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Ils peuvent se former sur des surfaces biotiques ou abiotiques d'une grande diversité.

Les biofilms se trouvent dans les sols , les eaux et même dans l'air où les bactéries forment des biofilms naturelles .En particuliers , les biofilms jouent un rôle fondamentale dans le recyclage de la biomasse des sols sur terre .ils permettent la décomposition de la matière organique , sont impliqués dans les cycles biogéochimiques de la plupart des éléments , entrent en jeu dans des nombreux processus tels que l'oxydation , la réduction , l'incorporation , la dégradation , la minéralisation , la conversion , ou encore le recyclage des éléments .

Dans les environnements terrestres en contact avec l'eau, la grande majorité des microorganismes se développent sur les surfaces immergées au sien de biofilm. On trouve ainsi des biofilms sur les roches des lacs, dans le fond des rivières, les fonds marins abyssaux et même aux interfaces air-liquide des eaux stagnantes. Ils participent également aux processus des écosystèmes immergés .En effet, ils jouent des rôles dans la modification physique et chimique des micro-habitats des cours d'eau, notamment par la rétention de particules en suspension.

### **12.2 Dans le domaine industriel :**

Les biofilms sont partout, sur le béton, le métal, les tuyaux, les circuits de distribution et d'épuration de l'eau, les machines dans les entreprises alimentaires (ex : laiterie) ou pharmaceutiques.

### **12.3 Chez l'homme :**

Les biofilms chez l'homme se rencontrent en deux endroit : autour de lui dans ses lieux de vie, et sur lui dans sa flore endogène.

Les biofilms naturellement développés sur l'homme constituent sa flore endogène. On parle de microbiote. Ils ont notamment une fonction protectrice et sont une barrière

biologique prévenant la prolifération de microorganisme pathogène et/ou opportunistes .ils sont rencontrées ainsi à la surface de la peau, dans la bouche ou encore au sein des appareils des grandes fonctions biologiques (système digestif, respiratoire, et urogénital).

Les biofilms se retrouvent dans les pièces à plus haut taux d'humidité et notamment dans la cuisine , les salles de bains ( sont des milieux propices pour la formation de biofilm).robinets , siphons , pommeaux , de douches , jouets de bain , porte- savon et brosse à dents ..Il est en effet estimé que des biofilms, comprenant notamment les espèces bactériennes S .aureus, E. coli et P. aeruginosa, se forment sur plus de 38 % de brosse à dents.

#### **12.4 Dans le domaine médical :**

En santé humaine, il a été montré que les biofilms sont associées à des problèmes majeurs de santé publique et sont impliqués dans un large éventail des maladies infectieuses qui touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés ou porteurs des prothèses médicales





*Chapitre II*  
*Biofilms mixtes et mécanisme de*  
*fonctionnement*

## 1. Introduction :

Le biofilm est une communauté multi-espèce .Si nous avons évoqué jusqu'à présent la formation de biofilm en utilisant *P.aeruginosa* comme modèle , il faut souligner qu'à l'état naturel , les biofilms sont des communautés bactériennes au sein desquelles on peut trouver de nombreuses espèces différentes dans les communautés , le transfert horizontal de gène est favorisé et les bactéries échangent leur matériel génétique à des fréquences très élevées .Récemment , il a été proposé que la formation des pilis conjugatifs était également un facteur déterminant pour la formation du biofilm proprement dit les conditions qui permettent la formation d'un biofilm mixte ne sont pas clairement établies ( **Smolin et al ,2003** ) .Ont suggéré que la mixité des populations est en partie dépendante de la nourriture , Ainsi , en présence de chlorobiphényle comme source de carbone .

*Pseudomonas putida*, peut se nourrir des métabolites produits par **BURKHOLDERIA**, et les deux espèces forment un biofilm mixte .En revanche, en présence de citrate, utilisable par les deux espèces et la mixité des biofilms peuvent être observés grâce à l'utilisation de technique de fluorescence. Les sondes phylogénétiques sont des oligonucléotides dérivés des ARN ribosomiques 16s et 23s couplés à des molécules fluorescentes , les bactéries peuvent également être étiquetées par l'introduction des gènes codants pour le GFP ( Green Fluorescent Protéine) ou la DSRed (Discosoma sp.red Fluorescent Protéine )sous le contrôle d'un promoteur constitutif , l'expression de ces protéines fluorescentes va permettre de pister une espèce donnée dans un environnement complexe .Ainsi il n'est pas rare d'observer à l'intérieur du biofilm des mouvements de bactéries passant d'une microcolonie à l'autre .Ces observations révèlent qu'à l'intérieur même du biofilm chaque micro-colonie est une petite communauté en soi (**Alexandra Dheily,2007**) .

Le biofilm dentaire est un exemple classique de biofilm multi-espèce complexe. Il semble que le Bacille une des classes les plus prédominantes dans le biofilm oral les deux Bacilles subtilis et *Streptococcus mutans* appartient à la classe des bacilles et sont utilisés comme organisme modèles pour étudier la formation de biofilm .Alors que *S.mutans* est une bactérie orale, *B.subtilis* est principalement considéré comme une bactérie du sol, cependant, *B.subtilis* a été isolé de différentes zones associées à l'environnement dentaire .Bien que l'association se Bacille. Les subtiles maladies dentaires restent floues.

*S.mutans* est considéré comme une bactérie causative principale de la carie dentaire , *Streptococcus* la virulence de *mutans* est due à sa capacité à former des biofilms à la surface de la dent , après l'adhésion , le saccharose alimentaire est métabolisé et transformé en glucane ou fructane , les polysaccharides intracellulaires .

*B. subtilis* est une bactérie gramme positif non pathogène, lorsque la formation de biofilm est déclenchée, les cellules *B. subtilis* se collent et produisent une matrice extracellulaire, la matrice consiste principalement en EP synthétisées par les produits de l'opéron *eps A-O* et en ALF codé par *tas A* situé dans l'opéron *tap A-sipw-tq sA*, l'importance de la *TqSA* dans un contexte de biofilm mono-espèce a été décrite précédemment à la fois dans les interactions cellule-cellule et la formation de biofilm, dans le contexte mono-espèce, *TqSA* est nécessaire au développement d'une architecture de colonie complexe est fourni une structure capable de maintenir les cellules ensemble. On sait pas encore, Si *TqSA* est responsable d'interactions similaires entre différentes espèces des bactéries dans un biofilm multi-espèces.

Dans la présente étude, *S. mutans* et *B. subtilis* ont été sélectionnées comme bactéries modèles pour étudier les interactions entre la formation de biofilm à deux espèces et pour étudier d'interactions entre la précurseur de ALF-*TqA* de *B. subtilis* et le EP de *Streptococcus* associée au dextran. *S. mutans* le dextran, est un polymère de glucose avec des liaisons  $\alpha$ . il s'agit d'un fragment chimique relativement simple qui peut être utilisé comme modèle pour un groupe plus importants de glucane. *B. subtilis* a été choisi pour son seul gène codant pour le *TqSA*. de plus, les deux bactéries, peuvent être trouvées dans le même habitat et donc interagissent biologiquement, ce qui indique que ce modèle peut apparaître dans l'environnement naturel. Les objectifs de la présente d'étude étaient de déterminer l'interaction directe entre les bactéries modèles (diaby kadi, 2017).

## 2- historique et Définitions des biofilms mixtes :

### 2.1 Historique :

Au sein de biofilm mixte chaque espèce bactérienne est confrontée à des changements dynamiques dans le profil nutritionnel soit en raison de variations environnementales, soit en raison de métabolisme et de la migration d'autre espèce, par conséquent la quantité de biomasse d'une espèce donnée dans un biofilm multi-espèce dépend fortement du comportement des autres espèces (Moon et al, 2009).

En 1991, Banks et Bryers ont monté dans une étude sur les biofilms de culture binaire que l'établissement d'un second organisme dans un biofilm existant est fonction de leur taux de croissance respectif. L'organisme à croissance rapide devient l'espèce dominante.

Dans une étude menée par Holo et ses Collaborateurs 2010. les souches fortement productrices de biofilm multi-espèce. Ces espèces étaient considérées comme des colonisateurs primaires qui fournissaient un abri à d'autres espèces faiblement productrices de biofilm en mono-espèce, créant ainsi une communauté des biofilms mixtes.

## 2.2 Définition :

Biofilm mixte : est une communauté physique, métabolique, et structuré des microorganismes (bactérie –bactérie ; bactérie –levure ; bactérie –champignon ; bactérie - Algue), enrobé d'une matrice hydratée riche en polymérase extracellulaires et en contact avec une surface biotique au abiotique.

Modification de la phase d'infection persistante tolérance aux antimicrocolonie résistance à la défense de l'hôte.

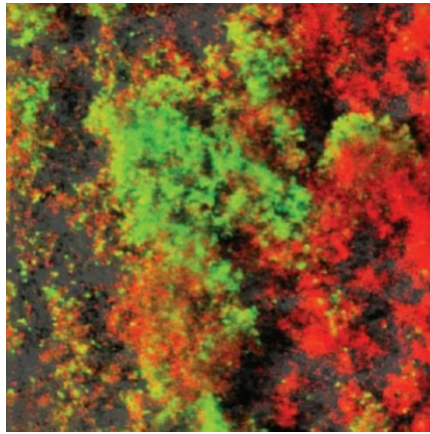
## 3. Une communauté bactérienne multi-espèce :

Si nous avons évoqué jusqu'à présent la formation de biofilm en utilise *P.aeruginosa* comme modèle, il faut souligner qu'à l'état naturel, les biofilms sont des communautés bactériennes au sein desquelles on peut trouver de nombreuse espèce différente dans la communauté.

le transfère horizontal de gène est favorisé et les bactéries échangent leur matériel génétique à des fréquences très élevés .Récemment , il a été proposé que la formation des pilis conjugatifs était également un facteur déterminant pour la formation du biofilm proprement dit les conditions qui permettent la formation d'une biofilm mixte ne sont pas clairement établies ( **Smolin et al 2003** ).Ont suggéré que la mixité des populations est en partie dépendante de la nourriture , Ainsi , en présence de chlorobiphényle comme source de carbone

*Pseudomonas putida*, peut se nourrir des métabolites produits par **BURKHOLDERIA**, et les deux espèces forment un biofilm mixte .En revanche, en présence de citrate, utilisable par les deux espèces et la mixité des biofilms peuvent être observés grâce à l'utilisation de technique de fluorescence.

les sondes phylogénétiques sont des oligonucléotidiques dérivés des ARN ribosomiques 16s et 23s couplés à des molécules fluorescentes , les bactéries peuvent également être étiquetées par l'introduction des gènes codants pour le GFP ( Green Fluorescent Protéine) ou la DSRed (*Discosoma sp.*red Fluorescent Protéine )sous le contrôle d'un promoteur constitutif (**figure 08**) , l'expression de ces protéines fluorescentes va permettre de pister une espèce donnée dans un environnement complexe .Ainsi il n'est pas rare d'observer à l'intérieure du biofilm des mouvements des bactéries passant d'une microcolonies à l'autre .Ces observations révèlent qu'à l'intérieure même du biofilm chaque microcolonie est une petite communauté en soi .



**Figure 08** : biofilm bactérien mixte les bactéries fluorescentes vertes ou rouge sont visualisées par l'utilisation d'un microscope confocale (confocale Sanning Laser microscopy .CSLM .)

#### 4. Caractérisation des biofilms microbiens :

Les biofilms mixtes sont des bactéries cultivables isolées du même environnement , nous avons visualisé et quantifier in vitro ces structures nos expérimentations ont démontré qu'en l'espace de 48h , un biofilm est formé , ceci démontre l'existence d'une interaction bactérienne .la communication entre les différentes espèces des microorganismes est favorisée par des systèmes complexes comme le Quorum sensing (Qs) , les modes de communication contrôlent , en partie la formation de biofilm (**Bjarnshol et al , 2005 ; Fazilif et al ,2014**) .

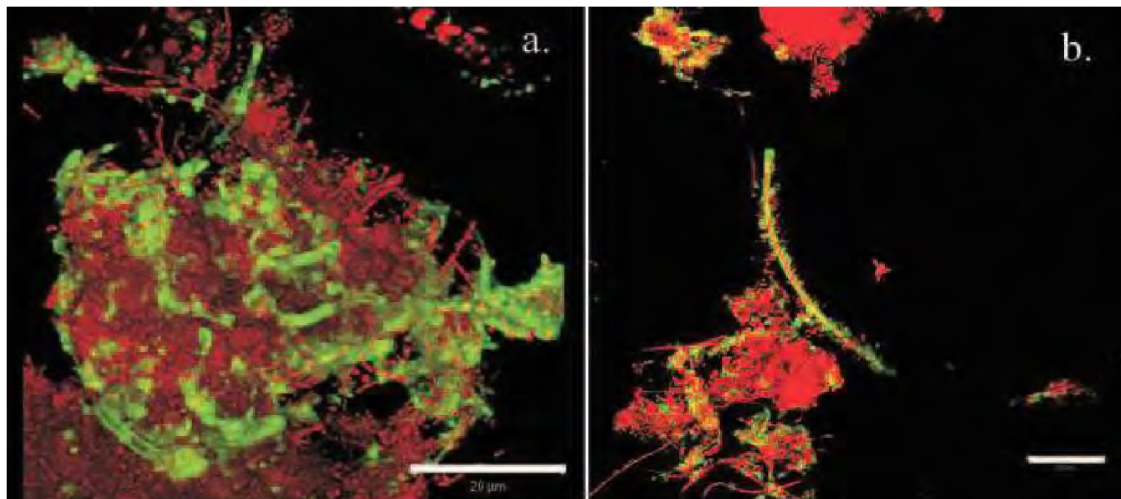
En effet, il a été démontré d'exopolysaccharide et les matériaux cellulaires (ADN, lipide, protéine) qui à façonnent la structure matrice extracellulaire et contrôlent ses propriétés physicochimiques (**Parsek et Grenberg ,2005 ; Dickschat, 2010 ; Wei et MA, 2013**).

#### 5. Exemple de matrice extracellulaire de biofilm multi-espèce :

Les biofilms naturels retrouvés dans les milieux aquatiques ou marins ainsi que dans le milieu industriel sont le plus souvent composés de communautés microbiennes multi-espèce ; la composition de la matrice extracellulaire est donc aussi variable que les espèces sont nombreux de même, les propriétés physico-chimiques ainsi que les interactions moléculaires sont plus variable et complexe que dans un système modèle mono-souche.

**Fang et al (2014)** Ont comparé la composition en SEP de trois biofilms phototrophes d'eau douce provenant d'un lac, d'une station de potabilisation et d'une station d'épuration, leurs

résultat ont montré que les SEP étroitement associées aux cellules étaient dominantes, avec une prépondérance des polysaccharides dans les biofilms issus des stations de traitement de l'eau, les substances humiques ne représentaient jamais plus de 15% des SEP dosées. Dans des boues de station d'épuration, la fraction protéique a été étudiée par (Larsen et al ,2008) qui ont montré qu'elle était constituée, pour partie, de fibre amyloïdes occupent entre 19 et 40 % du biovolume de dix boues différentes (figure 09).



**Figure 09** : Détection des adhésines amyloïdes dans des boues activées par marquage à l'aide d'un anticorps anti-WO1 (a) ou le marqueur thioflavine T (ThT) (b), tous deux spécifiques des fibres amyloïdes et couplés à l'iodure de propidium (en rouge). (Larsen et al, 2008)

Au cours de sa thèse , Cédric Caudan ( LBAE ,2008 ;2012) a par ailleurs montré une répartition spatiale des différentes SEP au sein des granules bactériens produits en réacteur pilote et impliqués dans un procédé aérobie de transformation de l'azote , Après marquage des protéines et des glucanes par des sondes fluorescentes l'observation en microscopies confocale révèle une matrice extracellulaire très organisée .En effet , les alpha-glucanes sont préférentiellement distribués en guanques polysaccharidiques entourant les bactéries , elles-mêmes en chassées dans un réseau protéique dense,

Une double approche , basée d'une part sur l'analyse des propriétés chimiques des biopolymères extracellulaires extraits des granules , et d'autre part sur des mesures des cohésions réalisées sur les granules après digestion enzymatique ou altération chimique a permis de conforter l'implication des protéines à caractère fortement anionique dans l'agrégation de la matrice (Caudan et al ,2014) .



## 6. Biofilm mixte (bactérie – bactérie)

### 6.1 Introduction :

Les bactéries de biofilms recouvrent donc des formations biologiques assez différentes et souvent très complexes, associant haute densité bactérienne, production de matrice et croissance sur une surface. D'un biofilm induit une expression différentielle des gènes, comparés à celle des bactéries planctoniques que (Whi-Teleywhi et al, 2001 ; Beloin et Ghigo, 2005), il faut également ajouter que l'ensemble des caractéristiques structurales et physico-chimiques du biofilm confère aux bactéries qui le composent des propriétés spécifiques de morphologie de croissance, de communication entre les cellules et de résistance au biocide, distinctes de celles des bactéries planctoniques.

Nous nous proposons, tout au long de cet article, de considérer le biofilm comme une « population organisée de microorganisme adhérent entre eux et surface, souvent englobée dans une matrice exopolymérique autoproduite et exprimant des propriétés biologiques spécifiques (figure 10).

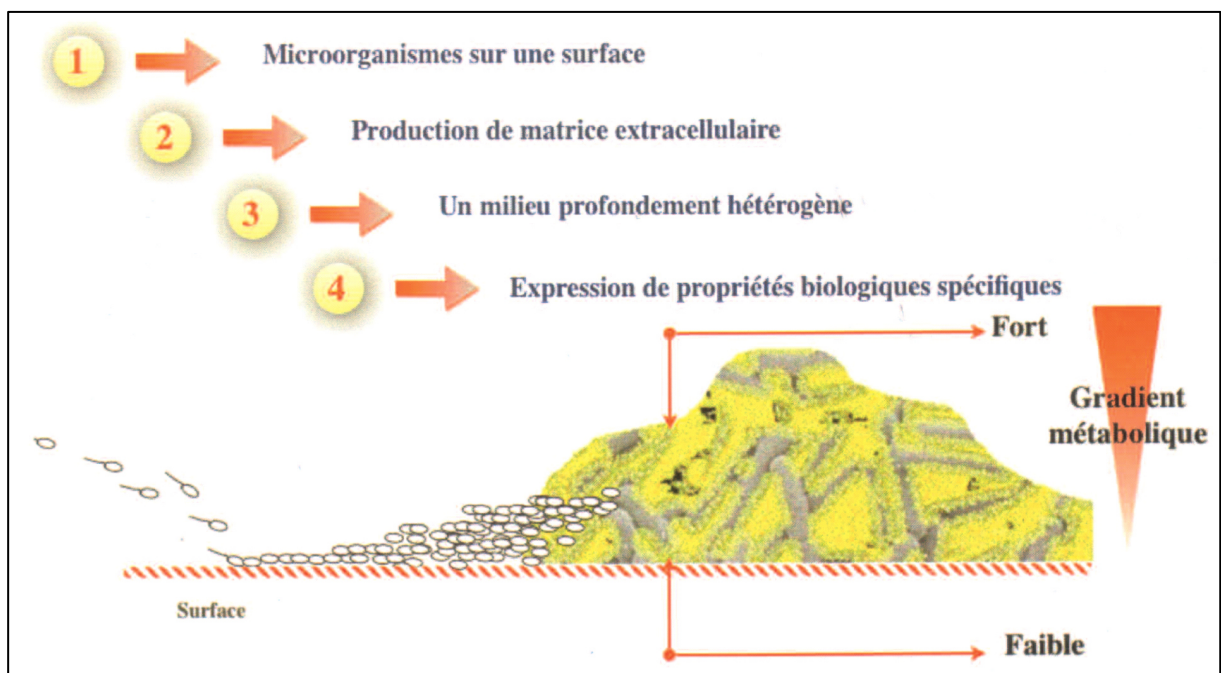


Figure 10 : points clés de la définition du biofilm (Agnès Roux et Jean Marc Ghigo, 2006)

## 6.2 Exemple biofilm mixte (bactérie-bactérie) *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae*.

La plupart des biofilms naturels sont composés de plusieurs espèces microbiennes (**Luca et al , 2014**) , interactions telles que la compétition , le commensalisme , le mutualisme et la parasitisme sont courantes entre les membres de la communauté au sein d'un biofilm d'espèce mixte , ce qui améliore la survie des microorganismes , plusieurs chercheurs ont également signalé que les bactéries qui sont incapables de former elles-mêmes un biofilm peuvent former en synergie un biofilm avec d'autres espèces bactériennes ( **Dingding et al , 2006 ; Chhiber et al , 2015**) .

Les conditions qui permettent la formation d'un biofilm mixte ne sont pas clairement établies, il a été suggéré que la mixité de population est en partie dépendante de la nourriture .Ainsi, en présence de chlorobiphényle comme source de carbone.

*Pseudomonas putida* peut se nourrir des métabolites produits par *Burkholderia*, et les deux espèces forment un biofilm mixte. En revanche, en présence de citrate, utilisable par les deux espèces, chacune formera son propre biofilm avec une structure radicalement différente (**Filloux et Vallet, 2003**).

On distingue différents types d'interactions qui ont des effets positifs ou négatifs pour les membres de la communauté bactérienne .On peut citer comme exemple bénéfique la coopération dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes, ou encore la production d'enzymes profitable à l'ensemble de la communauté de microorganismes (**Tonlin et al, 2005**) A l'opposé les différentes colonies des microorganismes occupant une même niche écologique entrent en compétition pour l'acquisition des ressources se trouvant dans le milieu , deux mécanismes de compétition entre bactérie est la production de bactériocines et la baisse de PH ( **Irie et Parsek , 2008**) .

*P.aeruginosa* est un organisme omniprésent capable de former des biofilms sur des nombreuses surfaces biotiques et abiotique et provoquant une grande variété d'infections parmi lesquelles celles attribuées aux DM contaminés .Elle fait partie des bactéries modèles les plus étudiées dans le contexte de biofilm (**Roux et Ghigo, 2006 ; Rochemonteix, 2009 ; Brandoni et al, 2013**).

*K.pneumoniae* est une bactérie gramme négative qui est responsable d'une panoplie de maladies y compris les infections respiratoires , des voies urinaires , et d'infections chroniques des plaies , la formation de biofilm chez cette bactérie est un facteur de virulence majeur utilisé pour coloniser l'hôte humaine(**Brandn et al ; 2013**) .

*K.pneumoniae* et *P.aeruginosa* sont deux organismes formant des biofilms qui peuvent coexister lors d'infections des voies urinaires , des voies respiratoires et des Brulures et



associées à des corps étrangers (**Brandon et al , 2013 ; Childers et al , 2013** ) , l'association entre plusieurs bactéries engendre des biofilms considérables par rapport à ceux formé d'une seule bactérie, et capable de former de biofilm mixte .

Cette association entre les deux bactéries est possible malgré la nature antagoniste de *P.aeruginosa* avec d'autres organismes, dans les cultures sessiles et planctoniques. Ces effecteurs comprennent l'élastase Las A et Las B (des protéines), N-homosérine lactone, la pyocyanine et les Rhamolipides qui peuvent tuer ou entraver la croissance de bactérie concurrente ou perturber et disperser des bactéries provenant des communautés de biofilm hétérogènes.

D'après **Brandon et al, 2013** la protéine de pointe fimbriale MrKO qui joue un rôle dans la physiologie du biofilm de *K.pneumoniae* et constitue un facteur important dans la pathogénèse, permet la compétition de *K.pneumoniae* avec de *P.aeruginosa* dans un biofilm à espèce mixte et fournit une défense contre les protéases microbiennes et dérivées de l'hôte.

Dans une étude réalisée par **Murga et al en 1995**, la variabilité de l'épaisseur de biofilm mixte formé par ces deux espèces ont été quantifiées .Cette étude a confirmé la caractérisation visuelle qualitative des biofilms de *P.aeruginosa* relativement épais le biofilm mixte en tant qu'intermédiaire et les biofilms de *K.pneumoniae* à faible épaisseur.

D'après les travaux de **Siebel et Characklis en 1991 ; et Steivant et al en 1997**, *P.aeruginosa* n'as pas dominé la population microbienne dans le biofilm en raison son excellente capacité de colonisation, cette bactérie construit la structure de base tandis que *K.pneumoniae* forme une structure en forme de tour au-dessus et persiste en raison de son taux de croissance le plus élevée, une structure similaire a été également observée dans une autre étude effectuée par Chhidber, (2015).

En effet et lorsque le biofilm à double espèces a été formé sur le disque de polycarbonate, un film supérieure de *K.pneumoniae* recouvert le biofilm basal de *P.aeruginosa*. Il était clair que *P.aeruginosa* colonisait le substrat tandis que *K.pneumoniae* était principalement présente dans la couche superficielle de biofilm.

## **7. Biofilm mixte (bactérie –levure) ;**

### **7.1 Introduction :**

Ces dernières années, plusieurs relations pathogéniques entre les bactéries gramme négatifs et les levures du genre *Candida* sp. ont été identifiées (**Levison et Pitsakis, 1987** ) , Ces microorganismes sont fréquemment isolés dans les biofilms des sondes d'intubation des

patients intubés et ventilés en Réanimation jouant un rôle de réservoir pour ensemençer le tractus respiratoire et renforcer la résistance aux anti-infectieux (Vincent et al , 2006) .

Les interactions entre les biofilms mixtes n'étant pas bien connues, le présent travail a pour objectif de déterminer in vitro la capacité de formation de biofilm bactérienne multi-espèce (bactérie – levure) isolées d'un même prélèvement. Ce travail est réalisé au niveau de laboratoire « ATB, antifongique ; physico-chimique, synthèse et activité biologique » de université Aboubakr Balkaid –Tlemcen.

### **7.2 Isolement et identification :**

Du 12 février au 22 mars 2018, cinq prélèvements de sonde d'aspiration trachéale, utilisées pour la libération des voies respiratoires de cinq patients de sexe masculin, âgé de 36 à 79 ans, ont été réalisés au service de réanimation du Centre Hospitalo Universitaire de Tlemcen (Tableau 02).

Treize souches, dont onze bactéries et deux levures ont été isolées sur les milieux de culture Mc Conkey et Sabouraud gélose. L'identification des bactéries par galerie API 20E et test d'oxydase a montré la présence de cinq souches d'*Acinetobacter baumannii* et de six souches d'entérobactéries dont 2 *Enterobacter cloacae*, 2 *Klebsiella pneumoniae* et 2 *Proteus mirabilis*. L'isolement des levures sur milieu Chrom Agar et les résultats des tests de blastèse et de RAT ont permis d'assigner les deux souches de levures isolées au genre espèce *Candida tropicalis*. (Tableau 02).

Répartition des souches identifiées par prélèvement et par patient souche d'entérobactéries dont 2 *Enterobacter cloacae*, 2 *Klebsiella pneumoniae* et 2 *Proteus mirabilis*. L'isolement des levures sur milieu Chrom Agar et les résultats des tests de blastèse et de RAT ont permis d'assigner les deux souches de levures isolées au genre espèce *Candida tropicalis*.

Tableau 02 : Répartition des souches identifiées par prélèvements et par patients

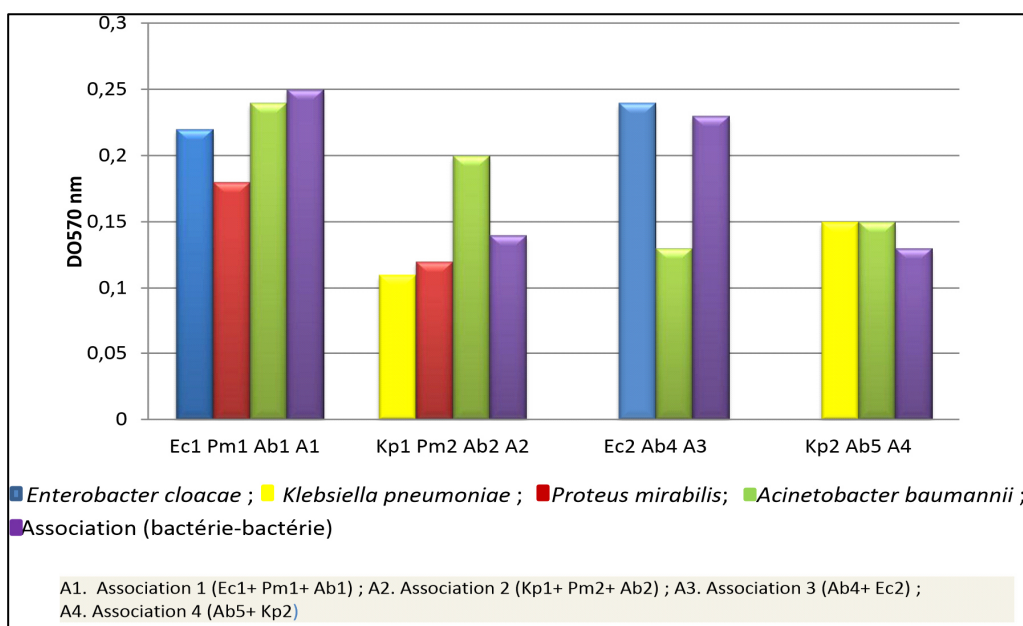
Patients	Age	Date D'admissi	Pathologie	Date de prélèvement	Souche identifiées
P1	36	14/02/2018	Détresse respiratoire sur pneumopathie	19/02/2018	<i>Enterobacter cloacae</i> 1, <i>Proteus mirabilis</i> 1, <i>Acinetobacter baumannii</i> 1, <i>Candida tropicalis</i> 1
P2	70	15/02/2018	Accident vasculaire cérébrale	20/02/2018	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1, <i>Proteus mirabilis</i> 2, <i>Acinetobacter baumann</i>
P3	79	03/03/2018	Insuffisance rénal	08/03/2018	<i>Acinetobacter baumannii</i> 3, <i>Candida tropicalis</i> 2
P4	40	11/03/2018	Polytraumatisme	15/03/2018	<i>Acinetobacter baumannii</i> 4, <i>Enterobacter cloacae</i> 2
P5	51	03/02/2018	Détresse respiratoire Sur Algue	22/03/2018	<i>Acinetobacter baumannii</i> 4, <i>Enterobacter cloacae</i> 2

La présence des souches de bactéries et de levures, dans les prélèvements des sondes d'aspiration trachéale réalisés par nos soins au service de réanimation, peut être expliquée par le détachement, spontané ou lors des aspirations, des souches formant les biofilms sur les sondes d'intubation. En effet, chez les patients intubés/trachéotomisés, les sondes d'intubation peuvent servir de réservoir pour les agents pathogènes en leur fournissant une surface à laquelle elles peuvent adhérer et former des biofilms. Leurs présence favorise également l'accumulation des sécrétions et du mucus trachéo-bronchique et offre un conduit direct aux microorganismes pathogènes pour atteindre les voies respiratoires inférieures ce qui augmente le risque d'infection (Shehata et al, 2012 ; M'hamedi et al, 2014). La dominance des

souches d'*Acinetobacter baumannii* parmi nos isolats cliniques est en accord avec des études précédentes (**Suri et al, 2000**) ; (**Elouennass et al, 2002**), qui ont montré la prédominance des souches d'*Acinetobacter baumannii* dans le tractus respiratoire. De même, une étude réalisée par Gil-Perotin et ses collaborateurs (2012) a montré qu'*Acinetobacter baumannii* représente l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les sécrétions respiratoires et les sondes d'intubations. Seules les souches de levure *Candida tropicalis* ont été identifiées parmi nos isolats cliniques. En termes d'épidémiologie et de virulence, cette espèce est l'une des plus importantes du genre *Candida*. Elle a été associée à des infections superficielles et systémiques partout dans le monde, en particulier chez des patients immunodéprimés, ou chez des individus présentant une réduction du microbiote par une utilisation antimicrobienne (**Zuza-Alves et al, 2017**).

2. Evaluation du potentiel des souches isolées à former des biofilms .Les biofilms constituent un réservoir infectieux pour un éventail des microorganismes procaryotes et eucaryotes, potentiellement pathogènes, ce qui nécessite des stratégies complexes des traitements antimicrobiens. Pour l'étude de la capacité des souches à former des biofilms, deux milieux de culture ont été utilisés : le RPMI 1640 et le Mueller Hinton liquide. La quantification de la biomasse a été réalisée par la méthode de cristal violet pour les biofilms mono-espèces et multi-espèces.

La capacité des bactéries, isolées d'un même prélèvement, à former des biofilms multi-espèces sur milieu Mueller Hinton liquide est représentée sur (**figure 11**).



**Figure 11** : Biomasse des biofilms multi-espèces bactériennes sur Mueller Hinton liquide par la méthode de cristal violet

### 7.3 Résultats :

Les souches de bacilles à Gram négatif ont montré des différences entre les biomasses des biofilms multi-espèces et celles des biofilms mono-espèce formés sur le même milieu de culture. La biomasse enregistrée pour l'association A1 (Ec1+ Pm1+ Ab1), était similaire à celle du biofilm formé par la souche *Acinetobacter baumannii* 1 en mono-espèce et supérieure à celles des souches de *Proteus mirabilis* 1 et *Enterobacter cloacae* 1. Pour l'association A2 (Kp1+ Pm2+ Ab2), la biomasse du biofilm multi-espèce est inférieure à celle de la souche *Acinetobacter baumannii* 2 et supérieure à celle de *Klebsiella pneumoniae* 1 et *Proteus mirabilis* 2. L'association A3 (Ab4+ Ec2) a montré une quantité de biomasse légèrement inférieure à celle de la souche *Enterobacter cloacae* 2 en mono-espèce.

La quantité de biomasse enregistrée pour l'association A4 (Ab5+ Kp2) était légèrement inférieure à celles des biofilms mono-espèces des souches *Acinetobacter baumannii* 5 et *Klebsiella pneumoniae* 2. Au sein des biofilms mixtes, chaque espèce bactérienne est confrontée à des changements dynamiques dans le profil nutritionnel, soit en raison de variations environnementales, soit en raison du métabolisme et de la migration d'autres espèces. Par conséquent, la quantité de biomasse d'une espèce donnée dans un biofilm multi-espèce dépend fortement du comportement des autres espèces (Moons et al, 2009). En 1991, Banks et Bryers ont montés dans une étude sur les biofilms de culture binaire que l'établissement d'un second organisme dans un biofilm existant est fonction de leur taux de croissance respectif, l'organisme à croissance rapide devient l'espèce dominante. Dans une

autre étude menée par Hola et ses collaborateurs (2010), les souches fortement productrices des biofilms en mono-espèces semblaient être responsables de la production des biofilms multi-espèces. Ces espèces étaient considérées comme des colonisateurs primaires qui fournissaient un abri à d'autres espèces faiblement productrices de biofilm en mono-espèce, créant ainsi une communauté de biofilms mixtes.

La capacité des bactéries et des levures *Candida tropicalis*, isolées d'un même prélèvement, à former des biofilms multi-espèces sur milieu RPMI 1640 est représentée sur (**figure 13**).

#### **7.4 Résultat :**

Dans ce travail ,Treize souche ont été isolées des prélèvements des sondes d'aspirations trachéales utilisées au service de réanimation du CHU de Tlemcen onze bacille à gramme négatifs ( 02 *Enterobacter cloacae* ) , ( 2*Klebsiella pneumoniae* ) , ( 2 *Proteus mirabilis* ) , ( 5*Acinobacter baumani* ) et deux *Condidas tropicalis* ont été identifier .

Leurs capacité à former des biofilms multi-espèces a été évaluées par la méthode de cristal de violet, les biomasses enregistrées étaient différents entre les espèces étudiés entre les souches des mêmes espèces et en fonction des milieux de cultures utilisés, des différents ont été également observé entre les biomasses des biofilms multi-espèces (Bactérie –Bactérie / Bactérie –levure).

L'impact des biofilms en santé publique et très évident. La formation d'un biofilm peut augmenter la résistance aux ATB aux des infectants et à la réponse immunitaire de l'hôte parce que les bactéries et les levures formant des biofilms ont des caractéristiques différentes de leurs homologues planctoniques, des nouveaux outils et des nouvelles approches pour la prévention , le traitement et le diagnostic de ces microorganismes pathogènes sont requis .

## **8. Biofilm mixte (bactérie – champignon) ;**

### **8.1 Introduction :**

Les champignons et les bactéries ont des nombreuses occasions d'interagis les uns avec les autres parce qu'ils cohabitent dans la plupart des environnements terrestres. En raison de leur diversité et de leur omniprésence, ces interactions sont importantes dans des nombreux domaines biologiques, y compris la biotechnologie, l'agriculture, la transformation des aliments, et de la médecine interaction moléculaires nécessitent un certain degré de proximité afin de permettre les échanges entre les partenaires, et dans certains cas, une association physique des partenaires est nécessaire pour une interaction fonctionnelle.

Une association physique commune entre les bactéries et les champignons et la formation de biofilm bactérienne sur la surface fongique, ce contact direct entre les cellules bactériennes

et les hyphes fongiques permet des interactions intimes qui sont impliqués dans divers processus biologique.

LSCM est particulièrement adaptée à l'étude des biofilms , car il permet une observation entros dimensions de la vie de biofilm hydraté avec prétraitement minimum , ce qui maintient la structure et de l'organisation de biofilm .Ainsi , l'analyse de biofilm par MCCL est très instructif , surtout à de termine l'évolution temporelle de la formation du biofilm et la détection des étapes caractéristiques de l'étape d'adhérence sur le développement d'un biofilm mature il est également particulièrement adaptée pour visualiser la structure de biofilm et de la matrice ou de quantifier la taille de biofilm , bien que cette méthode est adaptée à l'étude des biofilms sur des surfaces biotiques , abiotiques mince , étudier biofilm bactérienne sur une colonie des champignons filamenteux est encore très difficile . En effet la plupart des champignons filamenteux construires épaisses, complexes, des réseaux tridimensionnels en culture. Même ses des Object épais peuvent être imagées par microscopie confocale, l'atténuation de la pénétration du Laser et l'émission de fluorescence diminue souvent la qualité des images finales sur une profondeur de 50. De plus, parce que les colonies des champignons ne sont pas rigides .il est difficile à manipuler les microorganismes sans déranger les biofilms.

En raison de l'épaisseur des échantillons, les quelques analyser microscopiques des biofilms bactériennes sur les hyphes fongiques sont généralement effectuée sur une petite partie de la colonie fongique et peut ainsi apporter des biais dans l'analyse en cas de répartition hétérogène du biofilm au sein de la colonie fongique.

Pour sur montré ces difficultés, on rapporte un procédé par la croissance et d'analyse du biofilm bactérien, sur les hyphes fongiques. Cette méthode a été applique à l'étude de la formation de biofilm dans fluorescence BBC<sub>6</sub> sur les hyphes du basidiomycète éctomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N, ces deux microorganismes ferret –Sol ont été décrits précédemment pour former mixte biofilm –Like structures .Ce procédé peut être facilement adapté en outre a d'autres systèmes fongiques bactériennes filamenteuses. la méthode présentée ici , est basée sur la combinaison d'un procédé de culture de champignon , ce qui permet la croissance des colonies fongiques très minces , avec MCCL , et l'imagerie SEM , cela nous a permis d'obtenir des micros ( plages méso ( plage mm) échelle des vues sur l'interactions entre les deux microorganismes .Ce qui permet pour la caractérisation qualitative du biofilm .

## 8.2 Exemples de biofilm mixte (bactérie – champignon) ; (*Stenotrophomonas maltophilia*- *Aspergillus fumigatus*) :

*Aspergillus fumigatus* champignon filamenteux, et *Stenotrophomonas maltophilia* bactérie bacille gramme négatif tous deux saprophytes de l'environnement sont impliqués dans des phénomènes de colonisation pulmonaire prolongée opportunistes, ils peuvent être isolée séparément ou ensemble, lors d'infections aiguës chez l'immunodéprimé ou dans des affections respiratoires chroniques comme la mucoviscidose, la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et les dilatations de branche (DDB).

Les infections poly-microbiennes bactérie – champignon filamenteux sont encore mal connues et il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les interactions de ces microorganismes de règne différent leur physiologie et leur pathologie lorsqu'ils sont ensemble.

Il n'existe pas d'autre d'article analysant la virulence entre souches cliniques et environnementales de *S.maltophilia* en association avec *A.fumigatus*, démontrant pour la première fois que la Co-inoculation entre souche de référence d'origine chimique SmATCC 13637 et AFI3073), avait un effet synergique sur la mortalité des larves, contrairement à une Co-inoculation avec des souches d'origine animale et environnementale.

*A.fumigatus* et *S.maltophilia* colonisent le plus souvent les voies respiratoires de l'homme sous forme de biofilm, et non sous forme planctonique (libre dans leurs environnement) le biofilm correspond à une Organisation particulière des microorganismes (seul ou en association) adhérent à une surface biotique ou a biotique. Les microorganismes sont enchâssés dans une MES autoproduite qui les protègent des agressions extérieures, telle que les défenses immunitaires de l'hôte ou les antimicrobiennes depuis quelques années, les biofilms dans le milieu médical sont devenus une partie importante et ils représentent actuellement la forme privilégiée du mode de vie des microorganismes chez l'homme . nous deux micro-organismes d'intérêts.

*A.fumigatus* et *S.maltophilia* sont capable de former de biofilm ensemble. Au sein de laboratoire de L'E7380 à la faculté de médecine de Créteil, un modèle de biofilm mixte in vitro d'*A.fumigatus* de *S.maltophilia* a été développé sur support abiotique avec deux souches cliniques de référence (AF ATCC 13073 ET Sm ATCC 13637).

Il a été montré , grâce à ce modèle , que la bactérie avait un effet d'antibiose sur le champignon empêchant la pousse normale d'*A.fumigatus* , par ailleurs , l'effet des différentes souches cliniques , animales et environnementales d'*A.fumigatus* et de *S.maltophilia* sur la formation de biofilm mixte a été évalué in vitro , in vivo , la faisabilité de produire un biofilm



mono ou poly-espèces est encore rarement étudié et la pathogénicité de ces agents infectieux en association *in vivo* soit en biofilm , soit en planctonique , n'a pas encore été démontrée , dans ce contexte , il semblait pertinent de mettre en place des expérimentations rassemblant ces deux pathogènes *in vivo* .

Pour *S. maltophilia*, les souches d'origine humaine poussent plus rapidement que les autres à 37°C en planctonique. De la même façon, les souches d'origine humaine et animale forment plus de biofilm à 37°C après 24 h que les souches environnementales. Ces souches cliniques semblent plus adaptées à cette température. En revanche, la souche animale Sm A2, provenant du tractus respiratoire d'un cheval forme beaucoup de biofilm, alors que son taux de croissance sous forme planctonique est très faibles. Les souches environnementales ne possèdent ni une rapidité de croissance, ni une capacité de formation de biofilm élevée à 37°C. D'autres expériences, réalisées au laboratoire, ont montré que ces souches poussent de façon identique à 25-30°C. *S. maltophilia* étant une bactérie au réservoir environnemental, il est probable que ces souches adaptées à l'environnement poussent à une température plus basse. Un lien peut donc être fait entre croissance et formation de biofilm : les souches humaines poussent rapidement et forment beaucoup de biofilm à 37°C, alors que les souches environnementales poussent peu et ne forment pas de biofilm

## **9. Biofilm mixte (bactérie –Algue) :**

Les algues et les bactéries ont coexisté depuis les premiers stades de l'évolution. Cette coévolution a révolutionné la vie sur terre à bien des égards.

Les algues et les bactéries influencent ensemble des écosystèmes aussi variés que les grands fonds marins aux lichens et représentent tous les modes d'interactions imaginables - du mutualisme au parasitisme. Plusieurs études ont montré que les algues et les bactéries affectent en synergie la physiologie et le métabolisme de l'autre, un cas classique étant l'interaction algues-roseobacter. Ces interactions sont omniprésentes et définissent la productivité primaire dans la plupart des écosystèmes **(Ramanan et al, 2016)**.

L'interaction peut être syntrophique ou mutualiste. Dans les films lumineux contenant des bactéries et des algues, cela signifie que les bactéries peuvent être influencées par le métabolisme des algues, la situation inverse ou il y aura une influence mutuelle. En général, l'interaction est susceptible d'être médiée chimiquement. Même les interactions tactiques sont transduites chimiquement. Les molécules impliquées peuvent être grandes ou petites. Le tableau dessous montre certaines molécules qui pourraient influencer les interactions cellule-cellule **(Cooksey, 1992)**

Tableau 03 : Bases de l'interaction cellulaire dans les biofilms (Cooksey, 1992)

Composant	Implication potentielle dans le métabolisme consorsial
O <sub>2</sub>	Produit Par Les Phototrophes, Accepteur D'électrons Pour Les Hétérotrophes.
CO <sub>2</sub>	Produit Par Les Hétérotrophes, Source De Carbone Pour Les Phototrophes
N ou C organique	N Peut Etre Limitant A La Fois Phototrophe Ou Hétérotrophe. Le Carbone Pourrait Etre Utilisé Par L'un Ou L'autre Des Composants Du Biofilm.
Sources de P ou S	Aucune Information Sur L'excrétion, Mais La Lyse Pourrait Les Rendre Disponibles.
Molécules bioactives, allélochimiques, antibiotiques	Des Composés Tels Que L'amp Cyclique Ou Les Chimioattractants Peuvent Influencer L'établissement Du Biofilm. Vitamines, En Particulier B12 (Algues).
Substances polymériques extracellulaires	Limitation De Diffusion. Provoque Des Gradients Chimiques Abrupts. Limite La Motilité Cellulaire.
ADN	Pas Susceptible D'être Transféré De Procaryote A Eucaryote Ou Vice Versa, Mais Transfert De Procaryote A Procaryote Probable.

Les interactions algues-bactéries couvrent toute la gamme des relations symbiotiques qui sont considérées comme possibles. Les algues, les bactéries hétérotrophes et les archées sont respectivement les principaux producteurs et décomposeurs, ce qui en fait les piliers structurels de l'écosystème et de ses principales entités fonctionnelles (Amin et al, 2015). Bien que la fonction principale des bactéries hétérotrophes soit la décomposition, il est maintenant admis que certaines bactéries jouent également un rôle dans la promotion de la croissance des algues, établissant des interactions mutualistes (Ramanan et al, 2016).

### 9.1 Mutualisme

Croft et al. (2005), ont plaidé en faveur du mutualisme dans les auxotrophes de la vitamine B12, lorsqu'ils ont prouvés que les bactéries fournissaient la vitamine B12 aux algues en

échange de carbone fixe. D'autres études menées par ce groupe ont validé l'importance évolutive de ce mutualisme (Helliwell et al, 2011).

Une relation facultative a également été observée entre *Chlamydomonas reinhardtii*, l'algue verte modèle codant à la fois pour les méthionines synthases dépendantes de la vitamine B12 (METH) et indépendantes (METE), et les bactéries hétérotrophes qui délivrent de la vitamine B12 chaque fois que nécessaire, indiquant une large distribution d'une telle relation (Kazamia et al, 2012). L'apport de vitamine B12 par une bactérie associée entraîne la répression de l'expression du gène METE de *C. reinhardtii* et l'utilisation ultérieure de la vitamine B12 fournie, indiquant une relation opportuniste (Droop, 2007).

Le mutualisme ne se limite pas aux microalgues unicellulaires mais prévaut également chez les macroalgues, dans certains cas elles sont endosymbiotiques (Hollants et al, 2011). De tels échanges entre les communautés biotiques dans les écosystèmes aquatiques ont un rôle énorme dans le cycle de l'azote, du soufre, du carbone et du phosphore

Des nombreuses études ont mis en évidence le rôle de *Mesorhizobium* et *Azospirillum* dans la promotion de la croissance des algues et vice-versa (Gonzalez et Bashan, 2000 ; Hernandez et al, 2009 ; Watanabe et al, 2005). L'une des implications les plus importantes de ces études, en particulier de Bashan et de ses collègues, est que les algues dépendent de macronutriments tels que l'azote (N) car elles ne possèdent pas de mécanisme de fixation de l'azote et sont complétées par des bactéries, en particulier dans un environnement oligotrophe (Kim et al, 2014a)

## 9.2 Commensalisme

La plupart des associations algues-bactéries étudiées à ce jour sont soit mutualistes ou parasitaires ; la relation d'entrelacement est presque déficiente dans la littérature. Certaines études ont indiqués que les algues limitées en phosphore se surpassent, permettant aux commensaux bactériens d'être plus nombreux que les algues. De même, le rôle des nutriments, du rapport N : P, du carbone et de l'intensité lumineuse dans la régulation de la croissance de ces organismes en association a été en partie discuté (Grover, 2000 ; Gurung et al, 1999 ; Curriet Kalff, 1984)

## 9.3 Parasitisme

Des nombreuses bactéries sont connues pour affecter négativement les algues et donc très encourageantes pour les scientifiques étudiant le contrôle des microalgues et des

proliférations cyanobactériennes. De plus, les algues sont également des parasites, souvent pour leurs taxons supérieurs ou leurs propres homologues. En effet, les algues rouges sont considérées comme des parasites modèles. Environ 10 % des algues rouges connues sont parasitaires et le mécanisme de ce parasitisme est bien établi (**Ramanan et al, 2016**).

#### 9.4 Etude cas d'interaction entre algues et bactérie

Dans des conditions hétérotrophes, *Chlorellavulgaris* a montré une augmentation de l'accumulation d'acides gras et de lipides totaux lorsqu'elle est co-immobilisée avec *Azospirillumbrasilense*, qui est une bactérie favorisant la croissance des plantes supérieures (**Leyva et al, 2014**). De plus, la co-immobilisation facilitée par un apport externe de D-glucose et d'acétate de Na comme sources de carbone a entraîné une augmentation significative de la teneur en amidon et en glucide de *C. vulgaris* par rapport aux cellules d'algues immobilisées seules (**Choix et al, 2012**). Un effet d'amélioration similaire sur l'accumulation d'amidon et de glucide a également été trouvé dans les cellules de *C. vulgaris* lorsqu'elles sont co-immobilisées avec *A. brasilense* et cultivées dans des conditions photoautotrophes, par rapport aux cellules de *C. vulgaris* immobilisées seules et cultivées dans des conditions photoautotrophes (**Choix et al. 2012**).

Dans les processus d'upwelling, une étude a montré que le mutualisme se produit si les cellules d'*Emilianahuxleyi* sont physiologiquement saines. Dans cette situation la microalgue fixe le CO<sub>2</sub> par photosynthèse et synthétise la méthionine, la cystéine et le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) (**Wolfe et al, 1996 ; Wolfe et al, 1997**). Le DMSP est piégé par des rosesobactéries telles que *Phaeobactergallaeciensis*, qui à leur tour produisent des facteurs favorisant la croissance de la microalgue et des antibiotiques qui éliminent les bactéries pathogènes potentielles pour les cellules algales. Dans des conditions sous-optimales, *E. huxleyi* produit de l'acide p-coumarique qui déclenche la synthèse d'un algicide roséobactéricide par *P. gallaeciensis*. Cet algicide peut lyser la microalgue à des concentrations nanomolaires. Ainsi, les cellules bactériennes se nourrissent de la biomasse algale lysée (**Seyedsayamdost et al, 2011**).

Le tableau suivant fournit des exemples d'interactions microalgues-bactéries ayant des effets positifs sur la croissance des algues et l'accumulation de composés précieux.

**Tableau 04** : Exemples d'interactions microalgues-bactéries ayant des effets positifs sur la croissance des algues et l'accumulation des composés précieux (Fuentes et al, 2016)

Microalgue	Bactérie	Médiateurs issus des microalgues	Médiateurs de bactéries
Amélioration de la croissance des algues/diminution des coûts de production			
<i>E. huxleyi</i>	<i>P. gallaeciensis</i>	Dimethylsulphonio-propionate	Promoteurs et antibiotiques
<i>B. braunii</i>	<i>Rhizobium</i> sp.		AHL
<i>L. rostrate</i>	<i>M. loti</i>		Vitamine B <sub>12</sub>
<i>T. pseudonana</i> CCMP1335	<i>R. pomeroyi</i> DSS-3	2,3-dihydroxy-propane-1-sulfonate	Vitamine B <sub>12</sub>
<i>S. trochoidea</i>	<i>Marinobacter</i>	Molécules organiques	Vibrioferrine
<i>S. trochoidea</i>	<i>Roseobacter</i>	Molécules organiques	Vibrioferrine
<i>N. oleoabundans</i>	<i>A. vinelandii</i>		Siderophoree
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>A. vinelandii</i>		Siderophoree
Accumulation d'acides gras et des lipides			
<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i>		Fixation de l'azote médiée par les sidérophores
Accumulation hétérotrophe d'amidon et des glucides			
<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i>		Fixation de l'azote médiée par les sidérophores
<i>C. sorokiniana</i>	<i>A. brasilense</i>		Fixation de l'azote médiée par les sidérophores
Accumulation photoautotrophe d'amidon et des glucides			
<i>C. vulgaris</i>	<i>A. brasilense</i>		Fixation de l'azote médiée par les sidérophores
<i>C. sorokiniana</i>	<i>A. brasilense</i>		Fixation de l'azote médiée par les sidérophores

## 10- Biofilm mixte (bactéries - Protozoaires) :

Ces dernières années, les interactions protozoaires-bactéries ont reçu une attention croissante dans des études allant de l'écologie à la santé et aux maladies des consommateurs. Les protozoaires libres se trouvent couramment dans des environnements naturels comme les sols et les habitats aquatiques et dans des environnements anthropiques comme les piscines, les réseaux d'eau potable, les cuisines et les établissements de santé (**Raghupathi et al, 2018**)

Des interactions étroites entre les bactéries et les protozoaires dans les biofilms donnent lieu à une série d'adaptations dans les communautés bactériennes en favorisant des événements de transfert de gènes horizontaux, des capacités de détection de quorum et induisent des systèmes de sécrétion des protéines bactériennes (**Darby et al, 2002 ; Matz et al, 2004**) améliorant leur survie, leur dynamique et leur coexistence.

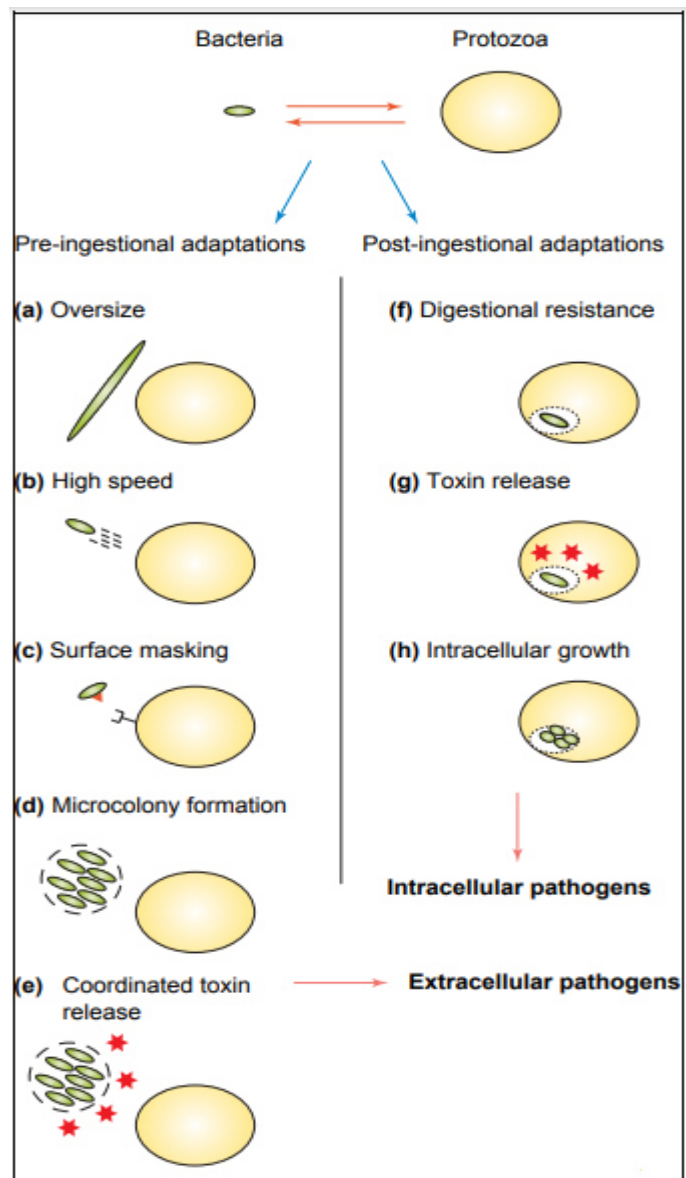
Les bactéries environnementales font partie intégrante des réseaux trophiques microbiens et, en tant que telles, sont constamment confrontées à une gamme des prédateurs et des parasites, tels que les protozoaires et les phages. La consommation par les protozoaires est considérée comme une source majeure de mortalité bactérienne dans la plupart des écosystèmes du sol, d'eaux douces et marines (**Matz et Kjelleberg, 2005**).

Les interactions entre bactéries et protozoaires présentent souvent la séquence d'une interaction prédateur-proie typique : contact, capture de proie et ingestion (phagocytose) (**Boenigk et Arndt, 2000**). La façon dont le contact et la capture sont obtenus par le prédateur protozoaire dépend du type d'alimentation, mais se termine généralement par forcer la cellule bactérienne dans une vacuole alimentaire où la digestion est initiée. Par conséquent, les adaptations bactériennes peuvent agir soit avant l'ingestion (pré-ingestion ou extracellulaire) soit après à l'intérieur de la vacuole alimentaire (post-ingestion ou intracellulaire) (**Figure 13**)

Une protection pré-ingestion fréquemment décrite consiste à acquérir une morphologie volumineuse et surdimensionnée (**Figure 13**). Par exemple, *Comamonas acidovorans* et *Flectobacillus sp.* Cultivé en présence du flagellé *Ochromonas sp.* Forment des cellules filamenteuses non comestibles (>10µm) (**Hahn et Hofle, 1998 ; Hahn et al, 1999**)

En conséquence, il a été rapporté que les bactéries filamenteuses s'accumulent pendant le pâturage des protozoaires dans divers habitats aquatiques (Hahn et Hofle, 2001 ; Jurgens et Matz, 2002). et que de telles « efflorescences filamenteuses » peuvent constituer >40 % de la biomasse bactérienne totale. Un autre trait adaptatif est l'augmentation de la motilité bactérienne (Figure 13). Dans une étude récente, des vitesses de nage supérieures à 30 mm sK1 ont réussi à inhiber la capture et la manipulation des proies par les flagellés bactérivores (Matz et Kjelleberg, 2005).

Des études de chimiostat avec des communautés bactériennes mixtes ont démontrés que de petites bactéries très mobiles sont capables d'établir une sous-population stable et prévalente pendant le broutage flagellé (Matz et Jurgens, 2002). Certains protozoaires sont capables de faire la distinction entre les proies par contact cellule-cellule en utilisant des récepteurs liés à la membrane (par exemple, les amibes). Wildschutte et ses collaborateurs ont récemment rapporté que les sérotypes de *Salmonella enterica* sont broutés par les amibes intestinales à des vitesses différentes en fonction de la variabilité de l'antigène O à la surface des cellules bactériennes (Figure 13).



**Figure 13 :** Aperçu schématique sur les voies potentielles d'adaptation bactérienne contre la prédation par les protozoaires et la transition hypothétique de la résistance au pâturage à la pathogénèse. Les flèches bleues indiquent les deux stratégies divergentes d'adaptations pré-ingestion (a-e) et post-ingestion (f-h) émergeant des interactions bactéries-protozoaires. Notez



le degré croissant de complexité et de coopération des mécanismes de protection. Les flèches rouges indiquent l'origine potentielle de la pathogénèse (Matz et Kjelleberg, 2005).

Les preuves des avantages de vivre dans des consortiums de cellules proviennent de *Pseudomonas spp.* Co-cultivés avec des brouteurs flagellés. Le broutage par les flagellés stimule la formation d'amas de cellules bactériennes, appelées microcolonies, dans une population bactérienne auparavant unicellulaire. En se collant les unes aux autres, les bactéries proies - en tant que groupe - atteignent une taille au-delà du spectre de taille de proie réalisable du prédateur (Figure 13) (Matz et Kjelleberg, 2005)

Huws et ces collaborateurs 2005 ont étudié l'effet d'*Acanthamoebacastellanii* et *Colpodamaupasidans* un biofilm mixte (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus epidermidis*)

L'épaisseur moyenne des biofilms formés sur les parois supérieures des Flow Cells montre qu'en l'absence de prédation, la maturation des communautés est biphasique. Dans la phase initiale de développement du biofilm (jours 1 à 4), l'épaisseur se stabilise à environ 200  $\mu\text{m}$ . Entre les jours 4 et 6, les communautés, ayant acquis une couverture totale du substrat disponible, s'épaississent considérablement pour donner des biofilms robustes d'environ 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. La deuxième phase de développement du biofilm a été totalement empêchée par la présence de *C. maupasi*, où l'épaisseur moyenne de la communauté a été maintenue en dessous de 200  $\mu\text{m}$  à tout moment. L'observation visuelle des communautés a montré que *C. maupasi* habitait de manière transitoire les surfaces exposées du biofilm, plutôt que de devenir intégralement associé à la matrice extracellulaire.

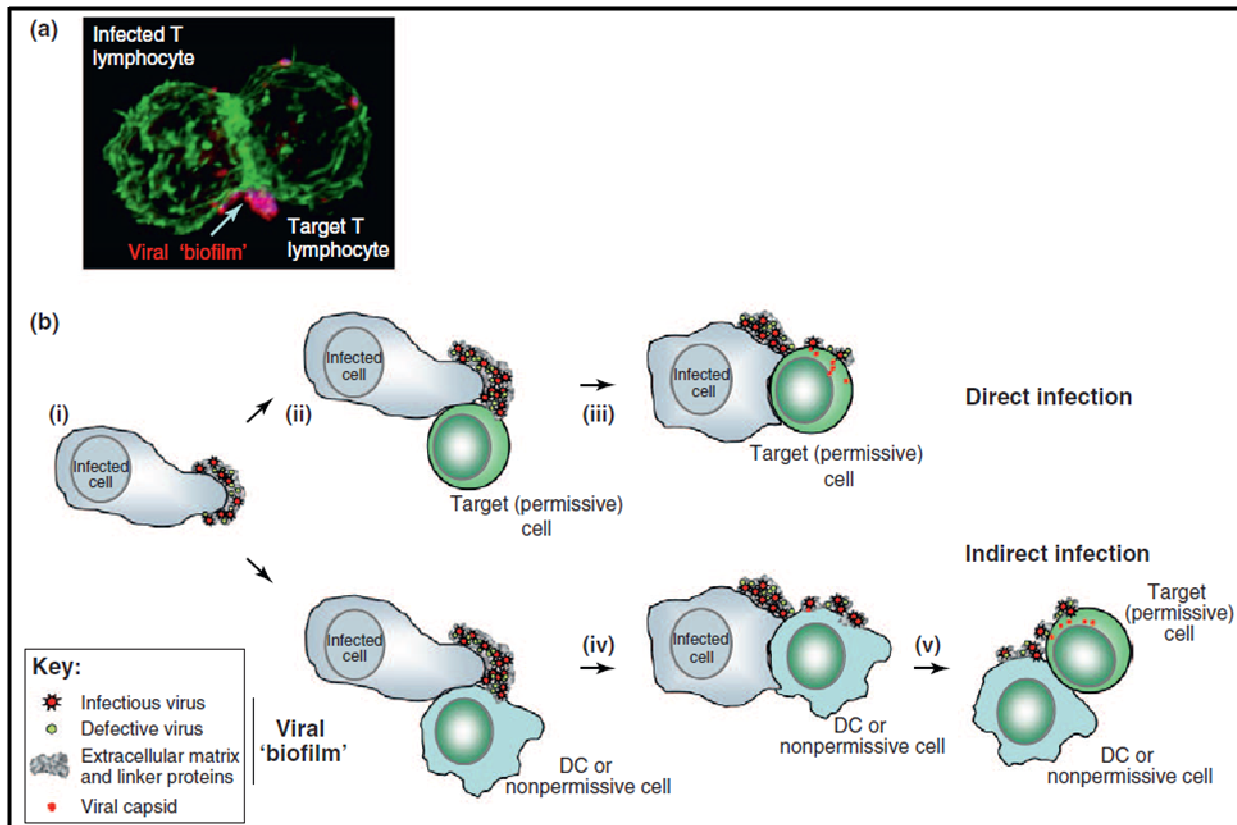
## 11- Biofilm viral

En tant que parasites intracellulaires stricts, les virus dépendent complètement de leurs cellules hôtes pour se répliquer. Après un cycle de réplication virale, les particules virales nouvellement formées produites par les cellules infectées doivent atteindre la surface d'autres cellules cibles non infectées pour démarrer un nouveau cycle de réplication virale. Cet état extracellulaire représente une étape cruciale pour la dissémination virale, car les particules virales sont exposées à des contraintes extracellulaires, notamment des variations physico-chimiques (telles que la dessiccation et les variations de pH), ou les défenses immunitaires de l'hôte.

Des nombreux aspects de ce mode de dissémination du virus sont largement inconnus, tels que (i) la nature et le mécanisme de formation des jonctions cellulaires qui interviennent dans la propagation du virus cellule-cellule, et (ii) la nature du matériel infectieux transféré. Ces deux facteurs dépendent du virus et du type de cellules infectées.

La découverte d'assemblages viraux extracellulaires avec les caractéristiques structurales et fonctionnelles des biofilms ouvre des nouvelles perspectives pour la compréhension de la dissémination du virus (Figure 13). Les virions pourraient bourgeonner à partir de la cellule infectée et être transitoirement concentré dans des structures protectrices de type biofilm qui restent collées à la surface de la cellule productrice de virus, mais prêtes à adhérer et à se propager à d'autres cellules (**Thoulouze et Alcover, 2010**).

Malgré leur résistance aux forces de cisaillement, les assemblages extracellulaires de HTLV-1 peuvent se décomposer et adhérer à la surface d'autres lymphocytes lors des contacts cellulaires, facilitant ainsi leur infection. Des fragments de biofilm, contenant à la fois des particules virales et la matrice, sont transférés (**Pais-Correia et al, 2010**), permettant la propagation à plusieurs cellules. Il est probable que la composition de la matrice d'inclusion soit étroitement régulée pour favoriser la cohésion de ces structures, tout en permettant le démontage de la structure et la libération des particules virales lors des contacts cellulaires (**Jones et al, 2008**).



**Figure 14 :** Les biofilms viraux, un nouveau mode de dissémination du virus.

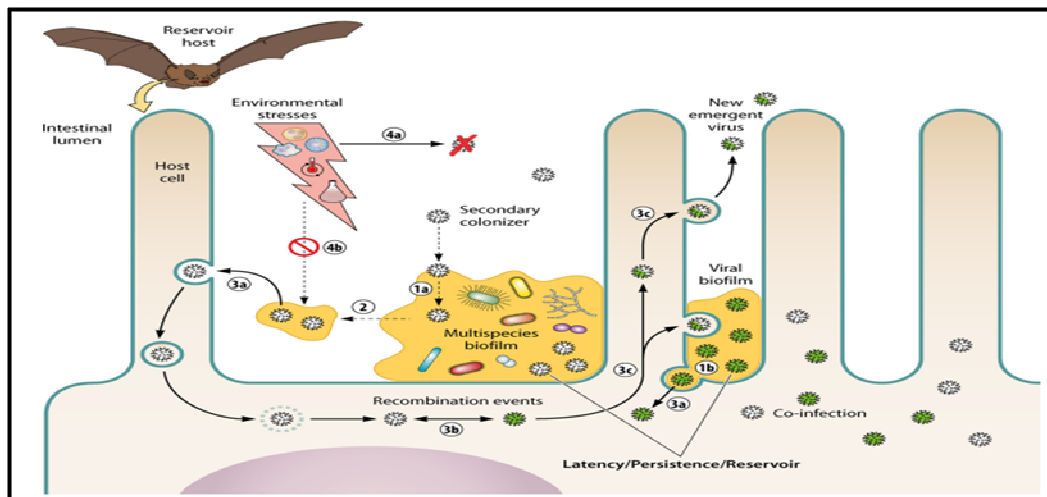
(a) Le transfert de « biofilms » viraux au site de contact entre deux cellules T CD4+ primaires d'une personne infectée par HTLV-1

(b) Modèle de transmission virale à travers des « biofilms » viraux, y compris (i) la formation de biofilms viraux à la surface des cellules infectées, (ii) le transfert de ces structures adhésives infectieuses par le biais d'interactions dynamiques entre les cellules infectées et non infectées (cellules permmissives ou non permmissives) . La rupture et l'adhésion de fragment de biofilm à la surface de ces cellules pourraient conduire à la fois à l'infection directe des cellules cibles permmissives (iii) et/ou à l'infection indirecte par des contacts avec d'autres cellules [par ex. cellules dendritiques (DC) ou cellules non permmissives] qui pourraient capturer des biofilms viraux à leur surface cellulaire (iv) et les transférer vers des cellules permmissives cibles (v) (« transinfection ») (Thoulouze et Alcover, 2010).

Les virus jouent un rôle écologique important et il a été rapporté qu'ils existent dans diverses communautés microbiennes sous forme des biofilms. Ils sont impliqués dans plusieurs dynamiques, telles que la diversité microbienne et les cycles biogéochimiques, en raison de leur prévalence et de leur variation dans divers écosystèmes (Von Borowski, 2021)

De plus, les entérovirus associés aux biofilms attachés aux parois des pipelines sont résistants à la pression d'écoulement et au désinfectant et peuvent représenter 95 % de la biomasse contaminante potentielle globale en contact direct avec l'eau (**Flemming et al, 2002**). En ce sens, l'article intitulé « Les virions entériques et les biofilms microbiens : une source secondaire de préoccupation de santé publique ? S'enquiert de la présence des virions pathogènes dans les biofilms des canalisations de distribution et de leur surveillance négligée (**Storey et Ashbolt, 2003**). Il est important de mentionner la détection de l'ARN du SARS-CoV-2 dans les eaux usées (**Ahmed et al, 2020**). Bien que l'isolement du virus infectieux à partir des matières fécales ait été décrit, aucun cas de transmission fécale-orale n'a été signalé (**Wang et al, 2020**).

Les virus, ainsi que d'autres micro-organismes, peuvent entrer en contact avec des biofilms préexistants et accidentellement adhérer et devenir une partie de ceux-ci, constituant ainsi des colonisateurs secondaires. Une étude de 2002 soutient que les biofilms peuvent englober un ensemble de virus entériques non enveloppés, y compris les calicivirus, les rotavirus spp. Les astrovirus spp. et le virus de l'hépatite A, entre autres micro-organismes tels que les bactéries à Grams négatifs et les champignons filamenteux (**Flemming et al, 2002**). Certains auteurs indiquent que la cavité buccale humaine peut être un site actif d'infection et un réservoir pour le SRAS-CoV-2, en supposant son interaction avec le microbiote buccal hôte (**Xiang et al, 2020**), qui se présente principalement sous forme de biofilm. Il est important de noter qu'il a été rapporté que les virions et les cellules eucaryotes infectées par le virus incrustées dans des biofilms conservent leur infectiosité (**azaheritehrani et al 2014**).



**Figure 15 :** Biofilms et virus. Les virus sont représentés dans l'espace extracellulaire sous forme planctonique ou biofilm.

(1a) Certains virus entrent en contact avec des biofilms préexistants (biofilm multispécifique) et y adhèrent, constituant des colonisateurs secondaires.

(1b) Certains virus sont enfermés dans un seul biofilm viral. Une fois ces structures établies, elles deviennent des réservoirs et pourraient persister comme un « état de latence », maintenant les particules virales infectantes dans le temps.

(2) Le détachement du biofilm permet aux virus de se propager et de libérer des virions qui coloniseront des nouveaux sites et infecteront des nouvelles cellules hôtes.

(3a) Un virion détaché de multi-espèces ou des biofilms viraux infectant la cellule hôte. (3b) Les échanges des gènes viraux et les événements de recombinaison sont possibles en présence de co-infections (exemplifiées par les virus verts et blancs) et peuvent conduire à l'émergence de nouveaux virus (3c).

(4) Les stress environnementaux tels que les produits chimiques, les réponses immunitaires (modulation immunitaire) et la dessiccation dans le milieu extracellulaire peuvent inactiver/éliminer les virions planctoniques (4a), tandis que les virions dans le biofilm, protégés par la matrice, sont plus tolérants à ces agents et peuvent rester infectieux dans le temps (4b) (Von Borowski, 2021)



## **Chapitre III**

### ***Les Méthodes***

### ***D'études De Biofilm***

**1. Introduction :**

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de microorganismes à la surface des dents (**Donlan, 2002**).

La mise en évidence de ces biofilms est longtemps restée anecdotique, en partie parce que les méthodes d'observations n'étaient pas suffisamment performantes. En 1993, lors d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium, Henrici observa, fixées sur ces lames, des communautés bactériennes, il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux sont organisées sous forme de communauté sessile fixées à une surface, et non pas sous forme planctonique (Henrici, 1933). Le concept de « biofilm » est né, mais le terme en lui-même n'est pas encore utilisé.

**Claude E. Zobell** (1904, 1989). Considéré comme le père de la microbiologie marine, démontre vers 1936 que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué. En 1943, il montra que de très faibles quantités des nutriments organiques s'absorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation des communautés bactériennes fixées sur les surfaces (**Casterton, 2004**).

C'est dans les années 1970, sous l'impulsion de Characklis puis de Casterton, que l'étude des biofilms a pris véritablement son essor. Les techniques utilisées à cette époque étaient essentiellement la microscopie électronique à balayage et les cultures microbiologiques, ces techniques ont permis de définir un certain nombre de caractéristiques inhérentes aux biofilms, par exemple, l'utilisation d'un colorant spécifique des polysaccharides, le rouge Ruthénium, couplée à un fixateur, le tétraoxide d'osmium, a permis de visualiser une matrice d'exopolymère englobant des agrégats cellulaires.

Plus récemment, la microscopie à balayage et les cultures ont été supplantées par d'autres techniques comme la microscopie confocale à balayage Laser et les outils des génies génétiques.

**2. Diversité des biofilms et Diversité des méthodes d'étude :**

Les techniques d'études des biofilms sont très variées. Cela est à mettre en relation avec la multitude des environnements dans lesquels les biofilms peuvent se former ; pipelines, Cathéters, dents, peau, racines, des plantes, poumons (par exemple en cas de mucoviscidose, etc.....). Cependant, même si les biofilms sont extrêmement diversifiés, il

est utile de mettre en place des méthodes d'étude reproductibles d'un laboratoire à un autre, afin de pouvoir comparer les données et les interpréter correctement (Maclean, 2004).

### **3. Les méthodes d'études de biofilm :**

La standardisation des méthodes d'étude des biofilms est nécessaire. Elle se fait selon un certain nombre de critères (Maclean, 2004).

#### **3.1 Choix des micro-organismes :**

Le choix des micro-organismes utilisés pour étudier la formation de biofilms repose sur plusieurs critères (Maclean, 2004)

- Capacité inhérente des micro-organismes à former des biofilms.
- Conditions de culture des micro-organismes (PH, température, nutriments, oxygène...).
- Stabilité génétique.
- Stabilité physiologique.
- Cinétique de formation du biofilm.
- Contamination.

Des études ont été réalisées avec une grande variété de micro-organismes, on peut citer entre autres ; *Escherichia coli* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Listeria monocytogenes* ; *Proteus* spp ; *Vibrio cholerae* ; *Yersinia pestis* ; *Bacillus subtilis* ; *Clostridium* spp.

#### **3.2 La polyculture : meilleur reflet de la réalité biologique :**

La grande majorité des études sur les biofilms sont réalisées en monoculture, c'est-à-dire que l'on étudie des biofilms formés d'une seule espèce de micro-organisme. L'avantage de la monoculture est que l'on peut plus facilement identifier survenues lors des changements de l'aspect des colonies (Maclean, 2004).

Néanmoins, dans la nature, les micro-organismes sous forme de biofilm sont rarement trouvés sous forme de culture pure ; les biofilms hétérogènes composés de plusieurs espèces de microorganismes sont prédominants, d'où l'existence d'une seconde méthode d'étude, plus complexe à mettre en œuvre mais plus proche de la réalité biologique ; la polyculture (Maclean, 2004). Certaines colonies des microorganismes sont pigmentées, il est donc facile de les identifier lors de polyculture, sinon, on peut identifier les espèces microbiennes par les techniques de génie génétique (on met une sonde d'ADN spécifique d'une bactérie et hybridation *in situ* permet d'identifier la bactérie concernée par fluorescence).

Les biofilms hétérogènes sont le siège d'un grand nombre d'interaction entre micro-organismes : action synergique, action négatives (compétition, parasitisme, prédation)



.lorsque les populations bactériennes atteignent un certain équilibre au sein du biofilm, seul un petit nombre d'espèce bactérienne qui deviennent lorsque changement des conditions environnementales (**Maclea, 2004**).

#### **4. Les différentes méthodes de d'obtention des biofilms :**

Des chercheurs ont développé différents modèles des biofilm artificiels, reproductibles d'un laboratoire à un autre (**Lemon ,2008**). Les cuves à flux continu sont des petites chambres à parois transparentes dans lesquelles des biofilms submergés peuvent se former et sont continuellement approvisionnés en nutriments comme indique le nom de la technique , les biofilms sont dans un milieu aqueux, caractérisé par un flux de liquide , dont la vitesse est constante , les biofilms formés dans ces cuves à flux continu peuvent être facilement observé avec les techniques de microscopie confocale à balayage Laser : On obtient ainsi des images de biofilm à tous leurs stades de développement , On peut observer des images de biofilm avec une structure « bourgeonnante » caractéristique , en forme de champignons séparés par des canaux aqueux .

On peut aussi réaliser des cultures en lats, en absence de flux .cette technique consiste à mettre des bactéries en culture dans des plaques de micro-titrage, sans flux avec ce système, On peut analyser rapidement des nombreux échantillons, cette méthode d'étude est utilisé en vue de séquençage des génomes des micro-organismes de même que le technique d'analyse de pellicule flottant a l'interface air-liquide. Elle consiste à recueillir des biofilms formés au niveau d'une interface liquide-air et analyse. En fin on peut obtenir des biofilms sous forme de colonies formées à la surface de milieu gélosé.

La plupart des souches bactériennes utilisées en laboratoire produisent des biofilms fragiles comparativement aux souches sauvages des mêmes espèces bactériennes, les souches auraient accumulé des mutations à la fin des années lors des expériences de culture en laboratoire et auraient subi en quelque sorte une domestication.

#### **5. Les différentes méthodes d'observations des biofilms :**

Les principales méthodes d'observation des biofilms sont la microscopie électronique à balayage et la microscopie confocale à Balayage laser.

##### **5.1 La microscopie électronique à balayage (MEB) :**

Est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons matières .Elle permet d'obtenir des images tridimensionnelles en haute résolution de la surface d'un échantillon .le principe est d'envoyer un faisceau d'électron sur la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, remet certaines particules.

Les particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface, le premier microscope électronique fut commercialisé en 1965.

La vision en relief du microscope électronique à balayage permet une bonne observation des micro-organismes grâce à sa profondeur de champ, nettement plus élevée que celle des microscopes optiques, mais progressivement, la microscopie électronique à balayage a été supplantée par la microscopie confocale à balayage laser.

### **5. 2 la microscopie confocale à balayage laser :**

Le principe de microscope confocale fut décrit en 1953 par Minsky. Il faut attendre la fin des années 1980 pour que les premiers modèles commerciaux apparaissent, rendant cette technique accessible à de nombreux laboratoires. La microscopie confocale est très utilisée en biologie ainsi qu'en science des matériaux. Elle se sont récemment imposées comme moyen d'investigation volumique et temporelle de spécimen.

Le principe de microscopie confocale à balayage laser est de pratiquer des coupes optiques virtuelles de très faibles profondeurs de champs (environ 600nm) dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans un plan donné, que l'on choisira à une représentation tridimensionnelle du spécimen est obtenue par construction d'une pile de coupes sériées dimensionnelles, se référant à des sections optiques dans des plans confocaux.

Le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes. Ces derniers sont auparavant répertoriés et choisis en fonction de leur propriété à se fixer sur des molécules particulières d'une structure ou d'un objet d'intérêt. Lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation grâce à un diaphragme variable appelé « phéno », il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation et d'éliminer le signal provenant des autres plans.

Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leurs longueurs d'onde puis détectés par des photomultiplicateurs puis, le signal reçu est converti en signal numérique, contribuant à la création d'une image numérique virtuelle. Cette image est typiquement codée sur 8 bits, parfois sur 12 bits ou 16 bits. Chaque section optique est générée en déplaçant le faisceau laser une partie du domaine admissible de l'échantillon.

La vitesse de balayage est limitée par l'inertie du système mécanique en mouvement. La profondeur du plan focal est ensuite modifiée finement grâce à un moteur contrôlé par ordinateur pour produire la séquence de sections.

Les lasers utilisés le plus fréquemment sont les suivants :

- Argon-ion (longueurs d'onde 457 nm, 488 nm, 514 nm).
- Hélium –néon (543 nm).
- Hélium -néon (633 nm).

La vision de relief permise par la microscopie électronique à balayage se prête bien l'observation de microorganisme, grâce à sa profondeur de champ. Les échantillons observés avec cette technique doivent néanmoins être préparés de façon rigoureuse, ce qui ne rend pas son utilisation très simple : trois échantillons doit être propre et sec avant d'être fixé, la microscopie confocale est plus facile d'utilisation .Elle permet également d'étudier les phénomènes dynamiques, sur des cellules ou des tissus vivants, en particulier grâce à l'utilisation de molécules fluorescents.

### **5.3 Etude de laboratoire versus étude :**

La plupart des études sur les biofilms sont menses en laboratoire, Elles sont complétées par des études mené sur le terrain, plus difficiles d'un point de vue logistique, mais plus proches des conditions réelles .Elle permettent de confirmé ou nom les hypothèses émise par les laboratoires et de propose des alternatives ou des nouvelles pistes de recherche.

Les difficultés de l'étude menées sur les terrains et d'ordre logistique les échantillons doivent être prélevés et stockés de la façon stérile possible (**Maclea** ,2004).

### **5.4 Techniques de prélèvements**

: Il existe plusieurs méthodes de prélèvements des biofilms sur les équipements de traite, de collecte et de stockage.

#### **5.4.1 Rinçage :**

Le pouvoir contaminant des installations de traite est estimé par un rinçage total Consistant à faire circuler pendant 5 minutes 20 à 30 litres d'eau stérile dans la machine à traire, les pulsateurs étant en fonctionnement. L'installation se met en circuit fermé par l'intermédiaire de la canalisation de nettoyage ou, lorsque celle-ci n'existe pas, une canalisation stérile est ajoutée. L'eau de rinçage est préparée dans un bidon stérile et aspirée dans la canalisation en amont des postes de traite ; le bidon servait également à recueillir cette eau à la sortie de la chambre de réception afin qu'elle puisse être recyclée (**Chatelin et Richard, 1981**).

Des volumes de 150-500 ml du liquide de rinçage sont ensuite récupérés dans des flacons stériles. Le rinçage peut se faire par lait UHT également. Cette technique consiste à faire

passer le lait demi-écrémé UHT dans le circuit habituel du lait afin de récupérer une partie des biofilms développés dans la surface donnée (**Laithier et Dartailh, 2014**).

#### **5.4.2 Chiffonnettes :**

Les prélèvements réalisés par chiffonnettes se font soit sur des zones peu accessibles (vanne de tank, coudes, records, etc.) soit sur/dans l'équipement à surface large (**Laithier et Dartailh, 2014**).

Les chiffonnettes sont ensuite mises dans des flocons d'eau physiologique et transmises au laboratoire.

#### **5.4.3 Ecouvillonnage :**

Celui-ci est utilisé pour les très petites surfaces et surtout les coins. Après grattage, l'écouvillon est aussi mis dans un flocon d'eau physiologique et transmis au laboratoire dans le plus proche délai.

#### **5.4.4 Récupération :**

Des échantillons Comme cité précédemment, le prélèvement des échantillons s'effectue aléatoirement et de façon aseptique dans des flacons stériles et étiquetés et qui se placent ensuite dans une glacière et acheminé directement aux laboratoires où ils se réfrigèrent à 4 °C (**Hamiroune et al, 2016**).

### **6. Analyse microbiologique :**

Les échantillons recueillis seront soumis à certains dénombrements tout dépend du type des biofilms (flores) recherchés (ées) (**Chatelin et Richard, 1981**).

- Flore aérobie mésophile sur gélose PCA, incubation 48 à 30°C,
- Flore psychotrope sur gélose PCA, incubation à 7°C,
- Bactéries coliformes sur milieu VRBL, incubation 24 h à 30-45°C ;
- Staphylocoques sur gélose Chapman incubation 24 h à 30° C,
- Levures et moisissures sur milieu Sabouraud, OGA ou PDA, incubation 5 jours à 25°C,
- Bactéries lactiques sur gélose MRS/ M17 ....Etc, Incubation 24-48 h à 30, 37, 45°C. Des tests d'identification phénotypique et/ou moléculaire sont nécessaires pour confirmer l'espèce.

## 7. Les méthodes caractérisations des biofilm :

### 7.1 Analyse des biofilms :

#### 7.1.1 Analyses in situ :

Détermination de la masse sèche Les biofilms formés sur les membranes d'esters de cellulose (membranes entières dans ce cas) sont déshydratés à l'aide d'un analyseur d'humidité (**Sartorius MA30**).

Les échantillons humides sont pesés puis chauffés à 45°C jusqu'à l'atteinte d'une masse constante, constituant le poids sec.

Le pourcentage d'humidité est ensuite calculé comme suit :

$$\% \text{ humidité} = \frac{\text{masse humide} - \text{masse sèche}}{\text{Masse humide}} * 100$$

#### 7.1.2 Spectroscopie infrarouge ATR-FTIR :

La technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) fait partie de la spectroscopie vibrationnelle et permet d'obtenir des informations sur la structure et la composition chimique des échantillons étudiés (**Nivens et al, 1995 ; Quilès et al, 2010 ; Humbert et Quilès ,2011 ; Pan et al, 2016**).

##### 7.1.2.1 Principe :

Cette technique permet de déterminer, de manière non destructive et en quelques minutes, la présence des groupements fonctionnels au sein des molécules. Un spectre est obtenu en irradiant l'échantillon dans le moyen infrarouge (entre 4 000 et 400 cm<sup>-1</sup>) et en déterminant quelle fraction du rayonnement incident est absorbée à une énergie particulière.

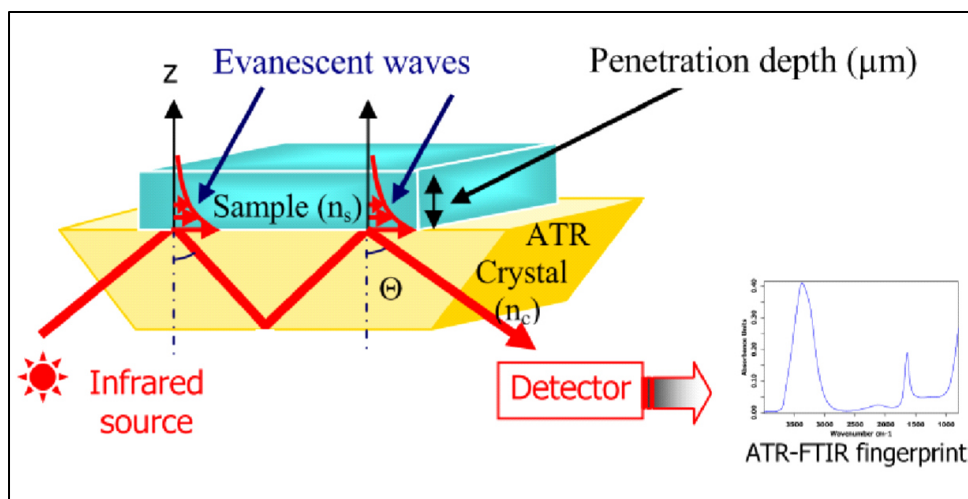
Toutes les radiations sont enregistrées de façon simultanée au moyen d'un interféromètre de Michelson. L'information est ensuite traduite en spectre à l'aide d'un algorithme mathématique (technique à transformée de Fourier) (**Schmitt et Flemming, 1994 ; Alvarez-Ordóñez et al. 2011**).

L'analyse par le mode Réflexion Totale Atténuée (ATR) consiste à appliquer l'échantillon sur un prisme de cristal de fort indice de réfraction (nc), soit en diamant (n= 2,38) soit en germanium (n= 4,02) (**Figure16**).

Le faisceau infrarouge pénètre dans le cristal ATR selon un angle typique  $\theta$  de 45° (par rapport à la surface du cristal) et est totalement réfléchi au niveau de l'interface cristal-échantillon. L'onde incidente pénètre sur quelques micromètres (de l'ordre de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$ )

dans l'échantillon dans lequel elle ne peut pas se propager, créant ainsi une onde dite évanescente.

Ainsi, la réflexion totale est atténuée suivant les transitions vibrationnelles absorbées par l'échantillon. Après une ou plusieurs réflexions internes, le faisceau infrarouge quitte le cristal ATR et est dirigé vers le détecteur (Schmitt et Flemming, 1994 ; Humbert et Quilès, 2011).



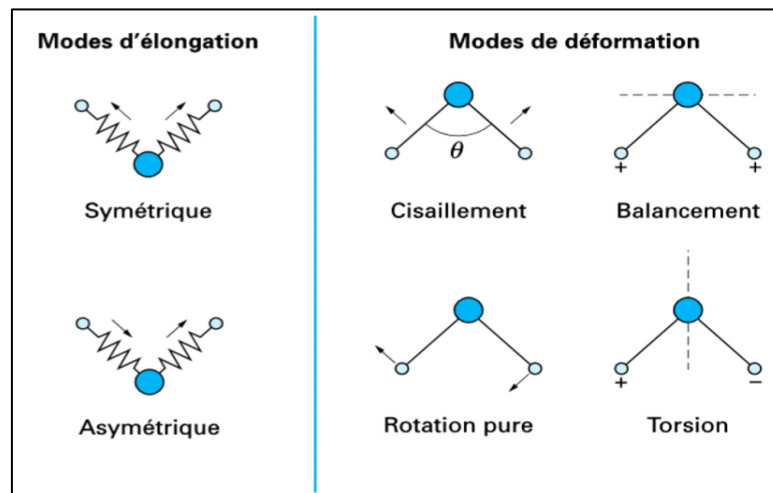
**Figure 16 :** Représentation schématique du FTIR-ATR,  $n_s$  correspond à l'indice de réfraction de l'échantillon,  $n_c$  l'indice de réfraction du cristal et  $\theta$  l'angle d'incidence (Humbert et Quilès, 2011).

Un spectre IR fournit ainsi une empreinte vibratoire spécifique de l'échantillon étudié, les différents pics correspondant aux bandes de vibration moléculaire des différentes molécules de l'échantillon (Humbert et Quilès, 2011).

Ainsi, pour un biofilm, les empreintes spectrales obtenues combinent les contributions des groupes fonctionnels présents dans toutes les molécules biochimiques de l'échantillon (composantes matricielles et cellulaires).

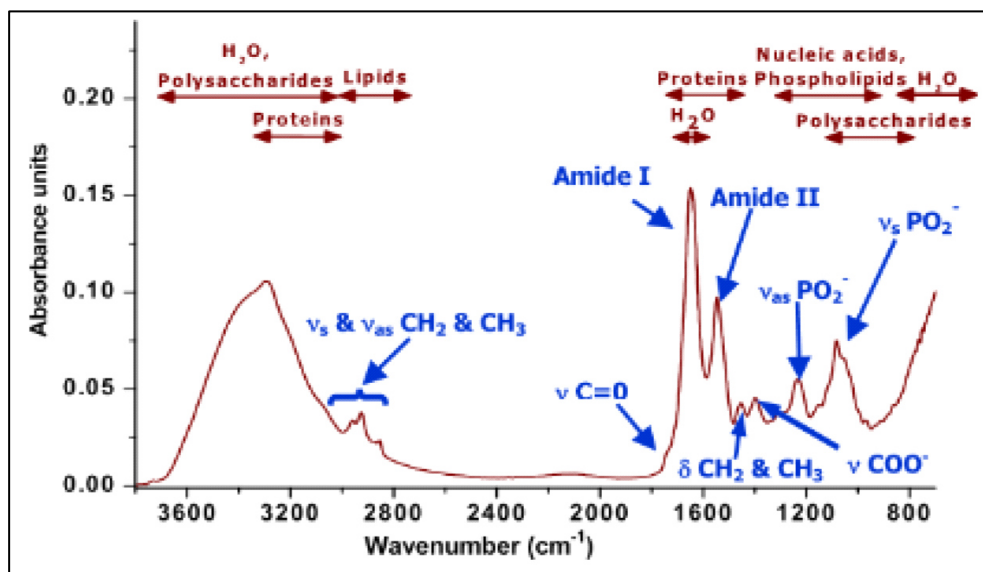
Deux modes de vibrations peuvent être observés (Figure 17), une vibration d'élongation (symétrique ou asymétrique) qui se caractérise par une modification de la longueur des liaisons des molécules et une vibration de déformation (cisaillement, balancement, rotation et torsion) pour laquelle une modification des angles est observée.

Ainsi, les molécules subissent une grande variété des mouvements vibratoires, caractéristiques de leurs atomes constitutifs et de leurs liaisons chimiques.



**Figure 17 :** Mode de vibration des molécules (illustré par une molécule CH<sub>2</sub>) (Dalibart and Servant 2000).

L'empreinte spectrale des cellules bactériennes est principalement composée de la superposition de pics d'absorption de 5 biomolécules (protéines, lipides ou phospholipides, polysaccharides et acides nucléiques) et de l'eau, dans le cas d'échantillons hydratés



**Figure 18 :** Spectre ATR-FTIR d'un culot partiellement déshydraté de *Pseudomonas fluorescens* en fine phase exponentielle de croissance (Humbert et Quilès , 2011) .

## **8- Marquage et observation des biofilms :**

L'observation en microscopie confocale à balayage laser étant délicate avec les membranes d'esters de cellulose du fait de leur auto-fluorescence, l'analyse en CLSM a été réalisée avec des biofilms formés sur un autre support : des membranes hydrophiles de polycarbonate noir Isopore™ GTBP 01300, commercialisées par Merck (diamètre 13 mm, pores de 0,2 µm représentant entre 5 et 20 % de la surface, et d'épaisseur 25 µm). Dans ce cas, les membranes sont déposées au centre de boîte de Pétri contenant le milieu gélosé adéquat pour la souche étudiée et inoculée par un dépôt en spot de 50 µL au centre de la membrane de suspension calibrée à 3.106 CFU.mL<sup>-1</sup> et 1.107 CFU.mL<sup>-1</sup> pour *P. aeruginosa* et *L. citreum* respectivement. Les boîtes sont ensuite incubées 24 h à la température adaptée afin de permettre le développement du biofilm.

Les biofilms obtenus sont ensuite transférés dans des puits de microplaque 24 puits pour procéder aux étapes de fixation et de marquage. La fixation est réalisée par ajout de 500 µL de formaldéhyde à 3,7 % dans chaque puits suivi d'une incubation de 24 h (microplaques placées dans un système hermétique en atmosphère humide) selon la méthode décrite par **(Randrianjatovo et al, 2015 ; Randrianjatovo-Gbalou et al, 2017)**. Après élimination du formaldéhyde, les biofilms sont rincés 3 fois avec 1 mL de PBS stérile (composé de tampon phosphate (0,01 M) et de chlorure de sodium (0,154 M)) avant de procéder à l'étape de marquage.

Trois marqueurs des spécificités différentes ont été utilisés

- L'épicoconone (Fluoroprofile Kit) permettant de marquer les protéines. Cette molécule pro-fluorescente ne fluorescence qu'en présence de sa cible, essentiellement un groupement amine primaire (-NH<sub>2</sub>) retrouvé dans les protéines sur laquelle elle se fixe de façon covalente.

- Le TOTOTM-1 est un agent intercalant (dimère de cyanines) également pro-fluorescent qui présente une très grande affinité avec les acides nucléiques et se lie de façon stable avec l'ADN double brin, notamment du fait de ses 4 charges positives **(Okshevsky et Meyer ,2014)**.

- Le marquage PAS (Periodic Acid Schiff) permettant de marquer les polysaccharides. L'acide périodique permet dans un premier temps d'oxyder les groupements hydroxyles vicinaux des sucres, puis les groupements aldéhydes formés sont révélés par la fuchsine (réactif de Schiff). La méthode PAS a l'avantage de cibler une large gamme de sucre contrairement à l'utilisation des lectines conjuguées à un fluorochrome qui ont une spécificité étroite pour un résidu osidique donné **(Amine Ben Mlouka et al, 2016)**.



Expérimentalement, les marquages ont été réalisés en plaçant les biofilms dans des microplaques 24 puits :

- Un premier biofilm sur lequel sera réalisé un co-marquage avec l'épicoconone et le TOTOTM-1®. Pour cela, le biofilm est mis en contact avec 40 µL de TOTOTM-1 à 2 µmol.L<sup>-1</sup> dans du DMSO pendant exactement 20 min ; l'échantillon est ensuite rincé 2 fois avec 50 µL de PBS stérile. Le biofilm est ensuite marqué par ajout de 40 µL de solution d'épicoconone (Fluoroprofile Protein Quantification kit), pendant 30 min, et finalement rincé 2 fois avec 50 µL de PBS stérile, selon la méthode décrite par **(Randrianjatovo et al, 2015; Randrianjatovo-Gbalou et al, 2017)**.
- Un second biofilm, obtenu lors de la même série d'expérimentations, est mis en contact avec 40 µL d'acide périodique à 0,5 % (dilué dans de l'acide acétique à 5%) pendant 30 min. Les biofilms sont ensuite rincés 2 fois par 50 µL de PBS stérile puis mis en contact avec 40 µL de réactif de Schiff pendant 2 h et, finalement rincés 2 fois avec 50 µL de PBS stérile.

Les membranes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec 50 µL de Mowiol® 4-88. Des 'spacers' ou espaceurs adhésifs (spacer Secure-Seal™ de diamètre 13 mm et 0,12 mm d'épaisseur ; Invitrogen™) sont utilisés pour éviter la compression des échantillons par la lamelle. La polymérisation du Mowiol est réalisée pendant une nuit à température ambiante sur une surface plane. Les lames sont ensuite conservées à 4°C à l'obscurité jusqu'à observation. Les différents échantillons ont été observés au moyen d'un microscope confocal Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, France) avec un objectif à immersion dans l'huile, 63x/0,9NA (acquisition réalisée à la plateforme d'imagerie FR AIB, Auzerville-Tolosane).

L'épicoconone et le PAS ont été excités avec un laser hélium-néon à 561 nm et la fenêtre d'acquisition de la lumière émise était de 570 à 650 nm. Dans le cas du marquage avec le marqueur TOTOTM-1, l'excitation a été réalisée avec un laser à argon à 488 nm avec une fenêtre d'acquisition de la lumière émise de 500 à 550 nm. L'acquisition des images avec le logiciel Leica LCS a été configurée pour prendre des numérisations d'images de 512x512 pixels (correspondant à 238 x 238 µm) à une vitesse de 400 Hz. L'analyse des images a ensuite été réalisée via le logiciel gratuit de Leica LASX.

### **8.1 Analyses ex situ :**

#### **8.1.1 Récupération des cellules bactériennes et dénombrement :**

Afin d'évaluer la population bactérienne, les cellules présentes sur chaque coupon (forme SSB ou biofilm) sont récupérées de manière « standardisée » de la façon suivante : le coupon est introduit dans un microtube avec 1 mL d'eau physiologique stérile (NaCl à 9 g.L<sup>-1</sup>), les

cellules sont décrochées par une série de 5 aspirations/refoulements en ciblant la surface de la membrane, puis le microtube contenant le coupon et la suspension est vortexé pendant 1 min pour s'assurer d'une récupération maximale.

Des dilutions décimales de cette suspension bactérienne sont ensuite réalisées en eau physiologique et 100  $\mu\text{L}$  de chaque suspension sont étalées en surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu adéquat afin de réaliser des dénombrements après 24 heures d'incubation. Les colonies sont dénombrées (boîtes contenant entre 15 et 300 colonies) et les résultats sont exprimés en(UFC.cm<sup>-2</sup>) ou en log10 (UFC.cm<sup>-2</sup>).

Le taux de récupération des cellules bactériennes déposées sur la membrane par la méthode décrite ci-dessus a été évalué. Pour cela, des échantillons ont été soumis à un deuxième traitement similaire : le coupon ayant subi la première phase de récupération est placée dans un nouveau microtube avec 1 mL d'eau physiologique stérile qui est vortexé à nouveau pendant 1 min, puis la suspension obtenue est dénombrée.

Le pourcentage de récupération (nombre des cellules récupérées lors du premier cycle par rapport à la totalité des cellules décrochées) est de l'ordre de 90 % ( $88,6 \pm 6,45$  dans le cas de cellules adhérees de *L. citreum*, n= 5, forme SSB). Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les spécifications de la membrane données par le fournisseur (taux de récupération > 90 % pour *Escherichia coli*) et les résultats obtenus dans les travaux de **(Marchal et al, 2012)**. Une étape de sonication supplémentaire initialement envisagée pour la récupération des cellules n'a donc pas été jugée nécessaire, limitant ainsi le stress apporté aux cellules par cette étape de récupération.

### **8.1.2 Analyse ex situ de l'ADN extracellulaire :**

L'analyse de l'ADNe a été réalisée à partir de biofilms de 24 h de *L. citreum* et de *P. aeruginosa* formés sur membranes d'esters de cellulose (voir p. 117) puis récupérés en eau physiologique comme précédemment décrit dans le cas des numérations bactériennes (voir p. 126). Une simple étape de centrifugation (20 min à 4000 g) a été ajoutée de façon à obtenir un surnageant comportant les composés matriciels solubles les plus faiblement liés, fraction appelée 'surnageant Biofilm'.

Des membranes non inoculées, mais incubées 24 h et traitées comme les biofilms, ont été utilisées en parallèle comme témoins pour vérifier l'absence d'interférence par des composés issus des milieux de culture. L'analyse de l'ADN extracellulaire présent dans ces échantillons a ensuite été réalisée avec différentes méthodes détaillées ci-dessus.

**8.1.3 Quantification de l'ADN extracellulaire :**

Par marquage au picogreen La quantification de l'ADN contenu dans les surnageants est réalisé au moyen du marqueur fluorescent Picogreen® en utilisant le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay. Une gamme d'ADN de 1000 ng.mL<sup>-1</sup> à 10 ng.mL<sup>-1</sup> est réalisée à partir d'une solution commerciale d'ADN lambda à 0,5 µg.µL<sup>-1</sup>. La solution de Picogreen® (200 X) est diluée en eau physiologique stérile à 1 X. Un volume de 50 µL d'échantillon ainsi qu'un volume de 50 µL de Picogreen 1 X sont ajoutés dans les puits d'une microplaque 96 puits. Après un temps de contact de 2 min, l'intensité de fluorescence émise à 520 nm (excitation à 485 nm) a été mesurée avec le FLUOstar Optima (BMG Labtech).

**8.1.4 Visualisation de l'ADNe par électrophorèse en gel d'agarose :**

L'électrophorèse classique en gel d'agarose est basée sur le principe que les acides nucléiques chargés négativement migrent vers l'anode lorsqu'un champ électrique est appliqué à ces derniers, la distance de migration est proportionnelle au poids moléculaire de la molécule. La visualisation des fragments est ensuite réalisée sous UV grâce à l'ajout dans le gel d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET). L'analyse des 'surnageants Biofilms' a ainsi été réalisée par dépôt de 10 µL d'échantillon additionné de 1 µL de tampon de charge 10 X (Glycérol 50 %, Bleu de bromophénol 0,25 %, Xylène cyanol 0,25 %, EDTA 0,2 M ; en TBE 0,5 X à pH 8), directement en gel d'agarose 1 % dans du tampon TBE 0,5 X (Tris-Borate-EDTA à 5 X : composé de Tris base (89 mm) et d'acide borique (89 mm), d'EDTA (2 mm) à pH 8,0).

Après une migration de 20 min à 50 V puis 1 h à 100 V en TBE 0,5 X, les molécules d'ADN sont colorées par marquage au BET à 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> et visualisées après exposition aux UV à 312 nm (E-Box VX5, Vilber). Le marqueur de taille utilisé est le SmartLadder (fragments de 200 à 10 000 pb), avec dépôt de 5 µL. Sauf indication contraire, l'ensemble des réactifs proviennent de Sigma-Aldrich.

**8.2 Amplification PCR :**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, Polymerase Chain Reaction) est une technique spécifique. La technique repose sur l'hybridation, à chaque extrémité du gène ou de la région à amplifier, d'une paire des courtes séquences oligonucléotidiques synthétisées chimiquement, appelées amorces et la synthèse d'une nouvelle matrice d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH de ces amorces (étape d'élongation) par une ADN polymérase thermostable. Pour amplifier spécifiquement l'ADN génomique de *P. aeruginosa*, le couple d'amorces Opr1/2 ciblant le gène oprL « peptidoglycan-associated outer membrane proteins » a été

utilisé (Zhang et al, 2015). L'ADN de *L. citreum* est amplifié avec les amorces LcitF/R qui ciblent le gène de l'ADNr 16S (Lee et al, 2000).

**Tableau 05** : Caractéristiques des amorces utilisées ( Martixu labadie

Souche	Gène cible	Nom	Sens	(5'--> 3')	Taille amplification	GC%	Tm (°C)
P.aeruginosa	OprL	OPR-1	F	GACGTACACGCGAAAGACCT	98 pb	55%	60,4
		OPR-2	R	GCCCAGAGCCATGTTGTACT		55%	60
L.citreum	16s RNA	Lcit-f	F	AAAACCTTAGTATCGCATGATATC	1298 pb	30,4%	52,6
		Lcit-f	R	TTAGACGACTCCCTCCCG		63,2%	58,6

Les différentes amorces utilisées, fournies sous forme déshydratée, proviennent de chez Eurogentec ou Eurofins. Une remise en suspension est réalisée en eau de qualité biologie moléculaire (sans DNases et RNases) à une concentration stock de 100  $\mu\text{M}$ , suspension conservée à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation. Le mélange réactionnel (volume final de 25  $\mu\text{L}$ ) est constitué d'eau qualité PCR, de tampon PCR 1 X, de  $\text{MgCl}_2$  à 1,5 mM, de dNTP à 200  $\mu\text{M}$ , des amorces spécifiques (forward F et reverse R) à 0,5  $\mu\text{M}$  chacune, de 0,025 U. $\mu\text{L}^{-1}$  (SilverStar DNA polymerase) et enfin de 2  $\mu\text{L}$  d'ADN à amplifier. Les amplifications sont réalisées avec le thermocycleur Gradient Master (Eppendorf). Le programme d'amplification pour l'ADN de *P. aeruginosa* est celui défini par (Zhang et al, 2015) : une étape préalable de dénaturation de 5 min à  $95^\circ\text{C}$ , puis 35 cycles composés de 15 s à  $95^\circ\text{C}$  (étape de dénaturation), de 45 s à  $60^\circ\text{C}$  (étape d'hybridation) et de 1 min à  $72^\circ\text{C}$  (étape d'élongation), et enfin une dernière étape réalisée à  $72^\circ\text{C}$  pendant 5 min. Pour l'amplification de l'ADN de *L. citreum*, le programme appliqué est le suivant : 5 min à  $95^\circ\text{C}$ , 15 s à  $95^\circ\text{C}$  (étape de dénaturation), 45 s à  $58,4^\circ\text{C}$  (étape d'hybridation), 1 min à  $72^\circ\text{C}$  (étape d'élongation) ; ces 3 étapes sont renouvelées 35 fois, puis une dernière étape est réalisée à  $72^\circ\text{C}$  pendant 5 min (Robert et al, 2009).

Dans chaque cas, un témoin négatif (sans ADN matrice) est réalisé ainsi qu'un témoin positif constitué d'ADN génomique extrait et purifié à partir de 0,5 mL d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance par extraction à l'aide du kit DNeasy® Blood and Tissue, selon les instructions du fournisseur. Les produits d'amplification sont

visualisés après migration en gel d'agarose à 1,5% dans du TBE 0,5 X pendant 30 min à 100V.

Dans chaque puits, 5  $\mu$ L de produit d'amplification sont déposés avec ajout de 1  $\mu$ L de tampon de charge 10 X.

Le marqueur de taille utilisé est le SmartLadder SF avec un dépôt de 5  $\mu$ L (fragments de 1000 à 100 pb). Les amplicons sont ensuite visualisés par coloration au BET (10 min) et exposition sous UV



***Conclusion  
Générale***

## **Conclusion Générale**

Le recherche bibliographie pour étudier le contexte et fonctionnement de biofilm mixte de deux especes bactériennes *P.aeruginosa* et *K .pneumoniae* et biofilm mixte bactérie – champignon (*Stenotrophomonas maltophilia* et *Aspergillus fumigatus*). Ce dernier permettra l'étude d'interaction entre épithélium respiratoire et biofilm mixte bactérie – champignon et l'analyse de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales respiratoire en présence de ce biofilm

La biofilm mixte à double espèces bactérienne *P.aeruginosa* et *K .pneumoniae* a révélé que les deux bactéries ont l'aptitude à produire des biofilms en Polystyrène et en verre les biofilms mixtes formés de *Condida albicans* et *Enterobacter cloacae*. L'adhérence de *Condida albicans* dépend fortement des espèces bactériennes présentes dans le milieu et leurs interactions avec la levure et par conséquent la formation de biofilm mixte. Dans la deuxieme étude de biofilm mixte bactérie – champignon La croissance D' *Aspergillus* est ralentie dans le biofilm mixte

Ce recherche bibliographique, mérite d'être continué en s'intéressant à étudier les différentes interactions entre les populations d'un biofilm mixte, le role des métabiltes excrétés tout en intégrant les méthodes moléculaires d'identification.



*Références*  
*Bibliographiques*



## Références bibliographiques

### Références bibliographiques

1. **Abukhweek, A ; N.S Fernandez Davila ; K.Caution ; A.Akhter ; B.A.Abdulrahman ; M, Tazi ; H.hassan ; L.A Novotny ; L.O .Bakaletz and A.O .Ameur ;(2013)** ; “ Biofilm derived legionella pneumophila evades the innate immune response in macrophages “. Front Cell Infect Microbiol 3.18.
- 2 **Agrés Roux et jean-Marc Ghigo (2006)** ; les biofilms bactériennes, Article.
3. **Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, Choi PM, Kitajima M, Simpson SL, Li J, Tschärke B, Verhagen R, Smith WJM, Zaugg J, Dierens L, Hugenholtz P, Thomas KV, Mueller JF.( 2020)**. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. Sci Total Environ 728:138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- 4 **.Ahmed, N, A; F.C, Petersen and A.A Scherie; (2009)** ; “ AI - 2/Lux S is involved in increased biofilm formation by Streptococcus intermedius in the presence of antibiotic “ Antimicrob Agents chemother 53(10) .
- 5 **.Alice de Chalvet de Rochemonteix (2009)** ; le biofilm de la peau ; thèse de doctorat ; faculté de médecine de Cretiel..
- 6 **.Alison D.G, Gilbert P, Lappin .Scott H.M and wilson M (2000)** ; community structure and co-operation in biofilms .Society for Genera.Microbiology .New York : cambridge university .Presse 59 Symposium.ISBN.-10.
- 8 **.Amin, S. A., Hmelo, L. R., Van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., ... & Armbrust, E. V. (2015)**. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. Nature, 522(7554), 98-101.
- 9 **.Amina Lamache ; Ibtissem Doghri ; Mario jacques et Saliha Boudjnah-Haroun (2020)** ; Etude des biofilms bactéries isolées à partir de système de distribution d'eau potable dans la région Sud-est de l'Algérie ; Revue des sciences de l'eau / Journal of water science ,32(4) ,447-461 [http:// doi,org/10.7202/1069](http://doi.org/10.7202/1069).
- 10 **.Anderson, D.I. and Hughes (2014)**. Microbiological effects of sub lethal levels of antibiotics; Nat REV Microbial; 12(7).
- 11 **.Arndt, H., Schmidt-Denter, K., Auer, B., & Weitere, M. (2003)**. Protozoans and biofilms. In Fossil and recent biofilms (pp. 161-179). Springer, Dordrecht.

## Références bibliographiques

---

- 12 **.Bagg, N ; M, -Schuster ;M – hentez , O .Ciofu; M , Givskov ; E, P , Green Derg and N. Hoiby (2004) ; ‘ ‘ Pseudomonas aeruginosa Biofilms exposed to imipenem exhibit change in global gene expression and beta-Lactamase and alginate production ‘ ‘ Antimicrob Agents chemother 48(4) .**
- 13 **.Balestrino D. (2006)."Formation De Biofilm Par Klebsiella Pneumoniae : Facteurs Impliqués Et Rôle Du Quorum-Sensing." Thèse de doctorat Clermont Ferrand. France 7-9.**
- 14 **.Beech, LB; ET Sunner, J, (2004); Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals .Curr .Opin Biotechnol, 15, 181-186.**
- 15 **.Beloin C ; Ghigo JM ; (2005) ;expression finding gene Patterns in bacterial biofilms ; Trends ; Microbiol ; 13;16-19 .**
- 16 **.Bezoui Mouna (2016) ; biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine : thèse de Doctorat ; université Mohammed V-RABAT.**
- 17 **.Bjarnsholt T ; P.J Ensen ; M.Bourmoll E ; M.Hentzer ; J.A, Haagenen ; H.P Hougen, H.Calum ; K.G, Hadesen ; C, Moser ; S.Moulin ; N, Hoiby et M.Givskov ;(2005) ; Pseudomonas aeruginosa Tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is Quorum sensing dependent ; Microbiology ; 151 ; 373- 383.**
- 18 **.Bjarnshot T; Jansen P.O ; Burmolle M ; Hentzer M ;Haagenen J ; A, Hougen H ; P, Calum , H ; Madsen , k .G ; Moser , C . Molin , S ; Hoiby , N and Givskov , M. (2005) ; Pseudomonas aeruginosa tolerance to tobramycin , hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is Quorum sensing dependant .Microbiology Reading ,( England ).**
- 19 **.Blanchette –cain , k ; C.A Hinojosa ; R.Akula Suresh Babu ; A –lez cano ; N , Gonzalez –juarbe ; C. Munoz –Almagro ; C, J .Sanchez ; M.A Bergman and C.J Orihuela ; (2013) ; ‘ ‘ Streptococcus pneumoniae biofilm formation is strain dependent , multifactorial , and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during Colonisation ‘ ‘ .mbio4(5) : e00745-00713.**
- 20 **.Boenigk, J. and Arndt, H. (2000), Particle handling during interception feeding by four species of heterotrophic nanoflagellates. J. Eukaryot. Microbiol. 47, 350–358**
- 21 **.Botto H. (2003) Infections urinaires nosocomiales de l’adulte. Médecine et**

## Références bibliographiques

---

- 22 **.Bruch, D .G .S; (2013);** Antimicrobial Therapy in veterinary medicine; John Wiley & son , Inc. ; 533-568 .
- 23 **.Bury .Moné S. (2007) ;** les biofilms : polycopie .Ecole normale supérieure de cachan.
24. **Choix, F. J., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2012).** Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme and microbial technology*, 51(5), 300-309.
25. **Choix, F. J., Luz, E., & Bashan, Y. (2012).** *Enzyme and Microbial Technology* Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, 51(5), 294-299.
- 26 **.Christensen GD., S. W., Bisno AL., Beachy EH. (2002).** "Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces." NCBI: 1-9.
- 27 **.Clutter buck AL ; (2008) ;** les biofilms et leur pertinence en médecine vétérinaire ; *Microbiologie Vétérinaire*.
- 28 **.Cooksey K.E. (1992),** *Bacterial and Algal Interactions in Biofilms*. In: Melo L.F., Bott T.R., Fletcher M., Capdeville B. (Eds) *Biofilms — Science and Technology*. NATO ASI Series (Series E: Applied Science) , vol 223. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1824-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1824-8_16)
- 29 **.Cora Miquel <sup>1</sup>Guennoc ; Christophe Rose<sup>2</sup> ; Frédéric Guinnet<sup>1</sup> ; Igor Miquel ; Jessy Labbé<sup>3</sup>, Aurélie Deveau<sup>1</sup> ; <sup>1</sup> Interactions Arbres – Microorganisme ; UMR 1136, INRA université de Lorraine .<sup>2</sup> Ecologie et Ecophysiologie forestières-PTEF, UMR 1137, INRA université de lorraine, <sup>3</sup>Biosciences Division .Oak Ridge National Laboratory.**
- 30 **.Costerton Jw (2004) ;** A short history of the development of the biofilm concept , *Methods of Studying biofilms* , Ghannoum M et O'Toole GA editors .*Microbial biofilms* .2687 - 2689..
- 31 **.Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., & Smith, A. G. (2005).** Algae acquire vitamin B 12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064), 90-93.

## Références bibliographiques

---

- 32 .Currie, D. J., & Kalff, J. (1984). A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus 1. *Limnology and Oceanography*, 29(2), 298-310.
- 33 . CVMA ;( 2008); “Antimicrobial prudent use guidelines 2008 for beef cattle, Poultry and swine.” CVMA Available from [http: // Camadian veterinarians .net /documents /CVma-antimicrobial –prudent –Use guidelines -2008-for-beef.diary-Poultry-sivine](http://Camadian veterinarians .net /documents /CVma-antimicrobial –prudent –Use guidelines -2008-for-beef.diary-Poultry-sivine) (Last accessed –Gurdasassi .
- 34 .Daddi Oubka ;( 2012); Pub Med .ncbi.nlm.nih.gov D-amino acids trigger biofilm disassembly .Pub Med.
- 35 .Darby, C., Hsu, J. W., Ghori, N., and Falkow, S. (2002). *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* 417, 243–244. doi: 10.1038/417243a
- 36 .Davies DG; (2011); Biofilm dispersion .In: biofilm highlights springer, Berlin.
- 37 .Davies, J. G.B Spiegelmen and G.Yan (2006).” The world of sub inhibitory antibiotic Concentration.”” Curr Opin Microbiol .9(5).
- 38 .Daw, K; A.S .Baghdayan; S.Awasthi and N.Shankar; (2012); « biofilm and planktonic Enterococcus Faecalis elicit different Responses from host phagocytes in Vitro “.FEMS immunol Meet Microbiol 65(2): 270-282.
- 39 .Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U. *et al.* Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchim Acta* 158, 1–27 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00604-006-0688-5>
- 40 .Derardja Asma ; Messaadia Soulef (2018) ; Recherche de biofilm mixte sur implants médicaux ; thèse de Master ; Université des frères Mentouri Constantine.
- 41 .Dobretsov, S; Teplitsiki, Met Paul, V ;( 2009); Mini –review: Quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. 25, 413-427.
- 42 .Domenech, M; E.Ramos-Sevillano; E.Garcia; M.Moscosa and J. Yuste; (2013); “Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of Streptococcus pneumoniae.” *infect immune* 81(7): 2606-2615.
- 43 .Donlan R.M et Costertion Jw ;(2002) ; Biofilm : mécanismes de survie des micro-organismes cliniquement pertinents .Clin Microbiol REv 15.

## Références bibliographiques

---

- 44 **.Donlan R.M, (2002)** ; Biofilms : vie microbienne sur les surfaces ; *energ infect Dis* 8.
- 45 **. Donlan R.M. (2001)** Biofilms and device-associated infections. *Emerging*
46. **Droop, M. R. (2007)**. Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of plankton research*, 29(2), 107-113.
- 47 **.Dupin Alban (2017)** ; intérêt des huiles essentielles dans la lutte contre l'antibioresistance induite par les biofilms ; thèse de Doctorat ; université Claude de BERNARD.
- 48 **.Ebert T, Smith S, Pancari G, Wu X, Zorman J, Clark D, Cook J, Burns C, Antonello M.J, Cope L, Nagy E, Meinke A, McNeely T (2011)** Development of a rat central venous catheter model for evaluation of vaccines to prevent *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* early biofilms, *Human Vaccines*, 7(6): 630-638. DOI : 10.4161/hv.7.6.15407.
- 49 **.Eluoenass, M ; Bajou, T ; lemnouer, A, H ; Foiss and V, Hervé, V & Baaj, A, J (2003)** ; *Actinobacter baumannii* ; etude la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V. Rabat Maroc ; *Médecine et maladies infectieuses* ; 33(7) ; 361-364.
- 50 **.Fazli M; H. Almbland ; M.L, Rybtke ; M. Givskov ; L.Eberl et T.Tolker Nielsen ; ( 2014)** ; Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Birkholderia* Species environ ; *Microbiol* , 16 1961-1981.
- 51 **.Filloux A, et Vollet I (2003)** ; Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne ; *Médecine /Science*.
- 52 **.Flemming H-C, Percival SL, Walker JT.( 2002)**. Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Supply* 2:271–280. <https://doi.org/10.2166/ws.2002.0032>
- 53 **.Fonseca, A.P et J.C Sousa (2007)** ; “ Effet de la contrainte de cisaillement sur la croissance, l'adhésion et la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* avec des changements morphologiques induit par les antibiotiques *Int J Agents antimicrobiens* .

## Références bibliographiques

---

- 54 **.Frank, k-L; E, J Reichert; K, E Piper and R. Patel ; (2007) ; “**  
In Vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm Forms of  
Staphylococcus lugdunensis clinical isolates “ Antimicrob Agents chemother 561(3) .
55. **Fuentes, J. L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del-Valle, M.,  
& Vilchez, C. (2016).** Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of  
algal biomass and associated compounds. Marine drugs, 14(5), 100.
- 56 **.Goller CC, Romeo T (2008)** Environnemental influence on  
biofilm développement .Curr. Top .Microbiol .Immunol .
- 57 **.Gomes, D.L ; R.S. Peixoto, E.A ; Barbosa, F. ; Napoleao, P.S ;  
Sabbadinis, K .R.dossantos, A ; Mattos –Guaraldi and R ; Hirata, Jr ; (2013) ; « «Sub  
Mic of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of  
Corynebacterium diphtheria strains ; J Med Microbiol 62(p15) .**
- 58 **.Gonzalez, L. E., & Bashan, Y. (2000).** Increased growth of the microalga *Chlorella*  
*vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-  
promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental  
Microbiology, 66(4), 1527-1531.
- 59 **.Grover, J. P. (2000).** Resource competition and community structure in aquatic  
microorganisms: experimental studies of algae and bacteria along a gradient of organic  
carbon to inorganic phosphorus supply. Journal of Plankton Research, 22(8), 1591-  
1610.
- 60 **.Guardabassi. L; L.B Jensen and H. Kruse, (2008);** Guide to  
antimicrobial use in animal’s oxford .UK; Ames, Iowa, Black well Pub.
- 61 **.Gurung, T. B., Urabe, J., & Nakanishi, M. (1999).** Regulation of the relationship  
between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance  
of light and nutrients. Aquatic Microbial Ecology, 17(1), 27-35.
- 62 **.Hahn, M.W. and Ho“fle, M.G. (2001),** Grazing of protozoa and its effect on  
populations of aquatic bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 35, 113–121
- 63 **.Hahn, M.W. and Hofle, M.G. (1998),** Grazing pressure by a bacterivorous flagellate  
reverses the relative abundance of *Comamonas acidovorans* PX54 and *Vibrio* strain  
CB5 in chemostat cocultures. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1910–1918

## Références bibliographiques

---

- 64 **.Hahn, M.W. et al. (1999)**, Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 25–35
- 65 **.Hanke, M.L .and Kielian; (2012)** ; “ Deciphering mechanisms of Staphylococcal biofilm evasion of host immunity “. *Front cell Infect Microbiol* 2: 62 .
- 66 **.Hanke, M.L et T.Keilian ; (2012)** ; “ Déciffrer les mécanismes de l’évasion du biofilm Staphylococcique de l’immunité de l’hôte .Les cellules Frontales infectent le microbiol 2(2) : 95 -108.
- 67 **.Haras D. (2005)** Biofilms et altérations des matériaux : De l’analyse du
- 68 **.Helliwell, K. E., Wheeler, G. L., Leptos, K. C., Goldstein, R. E., & Smith, A. G. (2011)**, Insights into the evolution of vitamin B12 auxotrophy from sequenced algal genomes. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2921-2933.
- 69 **.Henriçi AT; (1933)**; Studies of freshwater Bacteria: A direct microscopies technique, et al (2008) ; Biofilm development With an emphasis on *Bacillus subtilis* , *Curr Top Microbiol Immuno* .
- 70 **.Hernandez, J. P., de-Bashan, L. E., Rodriguez, D. J., Rodriguez, Y., & Bashan, Y. (2009)**, Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European journal of soil biology*, 45(1), 88-93.
- 71 **.Hollants, J., Leroux, O., Leliaert, F., Decleyre, H., De Clerck, O., & Willems, A. (2011)**, who is in there? Exploration of endophytic bacteria within the siphonous green seaweed *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *PLoS One*, 6(10), e26458.
- 72 **.http : //doi .org/10.1051/medsci/2003/9177 ;** alain filloux et isabelle vallet.
- 73 **.Hull Stodlay; (2002)**; Developmental Regulation of microbial biofilm *Curr opin, Biotechnol.*13 Google Scholar.
- 74 **.Huws, S. A., McBain, A. J., & Gilbert, P. (2005)**, Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *Journal of applied microbiology*, 98(1), 238-244.

## Références bibliographiques

---

- 75 **.Irie Y, Parsker MR ; (2008) ;** les mutations de détections du Quorum sensing affectent l'attachement et la stabilité de Microbiol Immunol.
- 76 **.Irina Randrianjatovo- Gbalou (2016) ;** substances exopolymérique de biofilm bactériens ; Quantification in Situ et étude de leur rôle dans la cohésion de la matrice Extracellulaire ; thèse de Doctorat ; université de Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier).
77. **Jones, K.S. et al. (2008),** Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4 (+) T cells. Nat. Med. 14, 429–436
78. **Jurgens, K. and Matz, C. (2002),** Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 81, 413–434
- 79 **.Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T. T. V., Croft, M. T., Sherwood, E., Sasso, S., ... & Smith, A. G. (2012),** Mutualistic interactions between vitamin B12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. Environmental microbiology, 14(6), 1466-1476.
- 80 **.Kim, B. H., Ramanan, R., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2014),** Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. Biomass and Bioenergy, 69, 95-105.
- 81 **.Kon K ; Rai M :(2012) ;** Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Thymus Vulgaris seule et en association avec d'autres huiles essentielles .Nu santara .Biosci.4 .
- 82 **.Kristain , S.A ; T,A. Birkenstock ;V.Souder ; D , Mark ; F , Gottz and landman ; (2008) ;** “ Biofilm formation induces C3a Release and protects Staphylococcus epidermidis from neutrophil –dependent killing “ J Infect Dis 197 (7) : 1028-1035.
- 83 **.Kuramistu, H.k., He.X ., Lux, R. ; Anderson, M.H ., et sgi, W (2007) .**interactions interspécifiques au sein des communautés microbiennes buccales .Microbiol.Mol .Bio.Rev 71, 653-6670, doi : 10-1128/MMBR 00024-07.
- 84 **.Lamourie Abdelmouman (2020) ;** Etude comparative de biofilm clinique in Vitro de secteurs médicaux entre quelques souches bactériennes : cas de l'hôpital d'EL-Meghaier ; thèse de Master ; Université de BISKRA.



## Références bibliographiques

---

- 85 .Lebeaux D, Ghigo J.M (2012) Infections associées aux biofilms  
Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale.  
médecine/sciences, 28(8-9) : 727-39. DOI : 10.1051/medsci/2012288015.
- 86 .Leid, J.G ; C.J. Wilson ; M.E Shirliff ; D.J .Hasset ; M.R  
Parsek and A.K Jaffers ; (2005) ; The exopolysaccharide alginate protects  
Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from TFN-gamma – mediated macrophage  
Killing “Front Microbiol 4:24.
- 87 . Levison, E; and Pitsakis, G; ‘1987); Susceptibility to  
experimental *Candida albicans* urinary tract infection in the rat; journal of infectious;  
Diseases 155; 841-846.
88. Leyva, L. A., Bashan, Y., Mendoza, A., & de-Bashan, L. E. (2014), Accumulation  
fatty acids of in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions in relation to activity  
of acetyl-CoA carboxylase, temperature, and co-immobilization with *Azospirillum*  
*brasiliense*. *Naturwissenschaften*, 101(10), 819-830.
- 89 .Li X.Z., Hauer B., Rosche B. (2007) Single-species microbial  
biofilm
- 90 .Liu Y et Tay, J.H ; (2002), Le Rôle essentiel de la force de  
cisaillement hydrodynamique dans la formation et de boues granulaires recherche sur  
l’eau, 36(7).
- 91 .Lowis; (2015); Article, Functional Gene composition, Diversity  
and Redundancy in Microbial Stream biofilm communities .<http://doi.org/10-1371/journal.Pone.0123179>.
- 92 .M.E Davey and G.A .O’Toole, “Microbial Biofilms”: From  
Ecology to Molecular Genetics Microbial, Mol Biol 64(4); 2000.[www.nature.org](http://www.nature.org).  
Original Article.
- 93 .M’hamedi ; (2014) ; Evaluation de la formation de biofilm des  
souches d’*Acinetobacter baumannii* isolée de dispositifs médicaux ; thèse Doctorat  
Université de Tlemcen, P66.
- 94 .Marchall, B .M; and S, B levy; (2011); “Food animals and  
antimicrobials: impact on human health.” *Clin Microbiol rev* (24) 4: 718-733.
- 95 .Marchall, B.M .and S.B levy (2011); food animals and  
antimicrobials: impacts on human health *Clin Microbiol Rev* (24) 4.

## Références bibliographiques

---

- 96 .Marie –Fleur DIRIEUX (2019) ; Contribution du modèle *Galleria mellonella* à l'étude des interactions entre *Aspergillus fumigatus* et *Stenotrophomonas maltophilia* ; étude de souches humaine, animales et environnementales ; thèse de Doctorat ; Université de l'imoges.
- 97 .Maritxu la Badie (2019) ; implication de composantes marticielle et cellulaire de biofilms bactériens modèles en réponse à des traitements physiques standardisation d'outils d'analyse et application aux technologies et de plasma froid et LED UV-C ; thèse de Doctorat ; université de Toulouse 3-Paul Sbatier.
98. Martín-Cereceda, M., Álvarez, A., Serrano, S., and Guinea, A. (2001), Confocal and light microscope examination of protozoa and other microorganisms in the biofilms from a rotating biological contactor wastewater treatment plant, *Acta Protozool.* 40, 263-272
- 99 . Martinez LR. et Casadevall A ; (2007) ; la formation du biofilm de *Cryptococcus neoformans* dépend du support de surface et de la source de carbone et réduit la sensibilité des cellules fongiques à la chaleur, au froid et à la lumière .UV, *Appl .Environ .Microbiol .*
100. Matz, C. and Jurgens, K. (2003), Interaction of nutrient limitation and protozoan grazing determines the phenotypic structure of a bacterial community. *Microb. Ecol.* 45, 384–398
101. Matz, C., and Kjelleberg, S. (2005), off the hook - How bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 13, 302–307. Doi: 10.1016/j.tim.2005.05.009
102. Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2004), Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environ. Microbiol.* 6, 218–226. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00556.x
103. Mazaheritehrani E, Sala A, Orsi CF, Neglia RG, Morace G, Blasi E, Cermelli C. (2014), Human pathogenic viruses are retained in and released by *Candida albicans* biofilm in vitro. *Virus Res* 179:153–160. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.10.018>.
- 104 . Mc Dougold, D, Rice, S.A.Barraud, N., Steinberg, PD. And Kjelleberg, S. (2012) .Should we stay or should wego: mechanisms and ecological

## Références bibliographiques

---

- consequence for biofilm dispersal .*Nat .Rev. Microbiol* .10, doi: 10, 1038/nrmicro 2635.
- 105** . **Med SCI (Paris) (2003)** ; Article journal de la société de biologie 201(3).281-289 (2007).
- 106** . **Missoum fatima Zohra (2018)** ; Etude de la formation de biofilm d'une collection de souches da Bacilles à gram Négatif ; thèse de Master ; université Aboubakr Belkaid Tlemcen.
- 107** . **Moon Christina ; Anna Kosa ; Paul D Hallet ; (2009)** ; Characterization of a novel air –liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 ; *Microbiology* ; 5(155) ; 1397-1406.
- 108** . **Moons, P; Mechinels C, W & Aertsen, A; (2009)**; Bacterial interactions in biofilms; **Grirical reviews**; *Microbiology*; 35(3); 157-16. Biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633-638. *Hors Série. Infectious Diseases*, 7(2), 277 *Maladies Infectieuses*, 33 223s–244s
- 109** . **Morgan, R. Kohn, S ; Hawang, S, H .Hasset, D.J, Et Sauer, K, (2006)**, BdlA, un Régulateur de chimiotoxie essentiel pour la dispersion du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* .*J. Bacterial*, 188.doi ; 10, 1128/ JB.00599-66.
- 110** . **Murry et lopez 1995**; The biofilm contains specialized cell types that arise from controlled *Mol microbial* 58; 51-66.
- 111** . **Nucléo, E, L ;S teffanoni; G , Fugazza ; R , Migliavacca ; E , Giacobone ; A. Navarra , La Pagani and P.Landini ; (2009)** ; Grouth in glucose –based medium and exposure to sub inhibitory concentration of imipenem iduce biofilm formation in a multidrug resistant clinical isolate of *Actinobacter baumannii* “*BMC Microbiol* “ .
- 112** . **O’Toole G A (2003)**. To build a biofilm. *Journal of bacteriology*; 185 (9) :
- Pais-Correia, A.M. et al. (2010)**, Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* 16, 83–89
- 113** . **Pantaléon 2015**, Article; the *Clostridium difficile* protease CWp 84 Modulates both biofilm formation and cell-surface proprieties. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124971>.
- 114** . **Parsek M.R et E.P Greenberg ;( 2005)**; *Sociomicrobiology*: The connection between Quorum sensing and biofilms; *Trends Microbiol*, 13; 27-33.

## Références bibliographiques

---

- 115 . **Pflumm M (2011)** caught on film. *Nat Med*, 17(6) : 650-653.  
DOI : 10.1038/nm0611-650
- 116 . phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*, 93, 27–41
- 117 . **Queck S-Y , wentere M , Moreno AM et al ; (2006)** ; The Role of Quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing . *Environ Microbiol*.
118. **Raghupathi, P. K., Liu, W., Sabbe, K., Houf, K., Burmølle, M., & Sørensen, S. J. (2018)**, Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan. *Frontiers in microbiology*, 8, 2649.
- 119 . **Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., López-Ribot J.L. (2005)** *Candida*
120. **Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016)**, Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, 34(1), 14-29.
- 121 . **Roux Agnés , et jean –Marc Ghigo** , « Bacterial Biofilms » ; <http://hdl.handle.net/2042/4782/files/18/47842.html>.
- 122 . **Saloun Giana ; Vella , Elizabeth A ; Reznikov , Marcia .Monaco, Sharon M .Donovan ; 2015** ; Article ; Régulation de la croissance cellulaire et de l’expression des gènes de virulence chez *staphylococcus aureus* par les protéines de liaison au fer lactoferrine et hémine ; Université de l’illinois à Urbana – Champaign.
123. **Seyedsayamdost, M. R., Carr, G., Kolter, R., & Clardy, J. (2011)**, Roseobacticides: small molecule modulators of an algal-bacterial symbiosis. *Journal of the American Chemical Society*, 133(45), 18343-18349.
- 124 . **Shehata ,I ; Shabban ,M ; Ibrahim , R ; Shokry Y ; ( 2012)** ; Endotracheal Tube biofilm and its relation ship to vantilator associated Pneumonia in Neanatal ICU ; *nature and science* ; 10 (12) ; 133-2014.
125. **Singh, M., Pandey, S., Kumar, A., & Pandey, K. D. (2021)**. Microbial biofilms for the remediation of contaminated water. In *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants* (pp. 255-269). Woodhead Publishing.

## Références bibliographiques

---

- 126 . **Spormaun AM; (2008);** Physiology of microbes in biofilms. Curr. Top. Microbiol .Immunol.
127. **Storey MV, Ashbolt NJ. (2003),** Enteric virions and microbial biofilms—a secondary source of public health concern? Water Sci Technol 48:97–104. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0172>.
- 128 . **Suri , A ; Mahapatra , A , K ; & Kapil , A ; (200) ;** Actinobacter infection in neuro surgical intensive care patients –National radical ; Journal of Indic 13(6) ; 296-300.
- 129 . **Thacker , P.A ; (2013) ;** “ Alternatives to antibiotics as growth promoters forvse in sivine production ; a review “ ; J Anim Scibiotechnol 4(1) : 1-12.
- 130 . **Thomas Brauge (2015) ;** Etude de exopolysaccharide de la matrice extracellulaire des biofilms de Listeria monocytogènes ; thèse de Doctorat ; Ecole doctorale de la matière, de rayonnement et de l’environnement.
131. **Thoulouze, M. I., & Alcover, A. (2011),** Can viruses form biofilms?. Trends in microbiology, 19(6), 257-262.
- 132 . **Thurlow, L.R; M.L, Hanke; Fritz I.L. Engebretsen, K.W; Bayles, A, R. Horswill and T. Kielian; (2001);** “Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in involved in biofilm formation “. Microbiology (51) P(5) : 1313-1323.
- 133 . **Tomeline ,R G , Mallot ; (2005) ;** Quorum sensing mutations affect attachment and stability Of Burkholderi cenocepacia biofilms , Appl Environ , Microbial .
- 134 . **Trenblay, Y .D, S.Hathroubi and M.Jacques; (2014);** « Bacterial Biofilms: their importance in animal health and public health. » Can J Vet Res 78(2) .
- 135 . **Van der Fals –Klerx , H.J ; L.F .Puister .Jansan , E.D .Van Asselt and S.L .G .E. Bourgers ; (2011) ;”** Form factors associated with the use of antibiotics in pig production “ ; Journal of animal Science ; 89(6) 1922-1929 .
- 136 . **Vincent, A ; Saint, G & Laprugne, G ; (2006) ;** infections associés aux soins fiches conseils pour la prévention de risque infectieux : infection. CCLIN ; Sud –East ; P : 02.

## Références bibliographiques

---

137. **Von Borowski, R. G., & Trentin, D. S. (2021)**, Biofilms and Coronavirus Reservoirs: a Perspective Review. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(18), e00859-21.
138. . **Wagner , M; Taherzadeh , D ; Haish , C ; Horn , H ; (2010 )**; investigation of the mesoscale structure and Volumetric features of biofilms Using optical coherence tomography biotechnology and Bioengineering 07(5) .
139. **Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. (2020)**, Detection of SARSCoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* 323:1843–1844. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>.
140. **Watanabe, K., Takihana, N., Aoyagi, H., Hanada, S., Watanabe, Y., Ohmura, N., ...and Tanaka, H. (2005)**, Symbiotic association in Chlorella culture. *FEMS microbiology ecology*, 51(2), 187-196.
141. . **WEI Q ET L.Z MA; (2013)**; Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa* *Int .J.Mol .Sci*; 14; 20983-21005.
142. . **Whiteley M; Bangera MG ;Bumgarnier RE ; Parsek MR; TEi T-Zed GM ; Lory S ; Grenberg EP ; (2001 )** ; Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *nature* ; 413; 860-864.
143. **Wildschutte, H. et al. (2004)**, Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10644–10649
144. **Wolfe, G. V., & Steinke, M. (1996)**, Grazing-activated production of dimethyl sulfide (DMS) by two clones of *Emiliana huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 41(6), 1151-1160.
145. **Wolfe, G. V., Steinke, M., & Kirst, G. O. (1997)**, Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga. *Nature*, 387(6636), 894-897.
146. **Xiang Z, Koo H, Chen Q, Zhou X, Liu Y, Simon-Soro A. (2020)**, Potential implications of SARS-CoV-2 oral infection in the host microbiota. *J Oral Microbiol* 13:1853451. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1853451>