



Université de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
Sciences de la Terre et de l'Univers



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à
l'Environnement*

« LAMAABE »

MEMOIRE

Présenté par

BELHADJ KACEM Samia

BENNAI Amina Oumaima

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie Fondamentale

Thème

**Evaluation de biofilm mixte de bactérie d'origine hospitalière sur
différents supports abiotiques**

Soutenu le 14/06/2020, devant le jury composé de :

Président	REBIAHI Sid Ahmed	Maître de conférences A	Université Tlemcen
Promoteur	HASSAINE Hafida	Professeur	Université Tlemcen
Examinatrice	BELLIFA Samia	Maître de conférences B	Université Tlemcen

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Nos très chers parents pour lesquels le remerciement ne sera jamais suffisant pour récompenser leurs immenses sacrifices, leur soutien et appui inconditionnel durant toutes les périodes de notre vie...Ce travail est le fruit de vos efforts, de vos prières incessantes, de votre tendresse, et de votre amour. On espère rester toujours digne de votre estime et ne jamais vous décevoir. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

Nous commençons tout d'abord par remercier le bon Dieu de nous avoir donné le courage et la volonté de réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement « LAMAABE » de l'Université Abou Berk Belkaid sous la direction de Madame **HASSAINE Hafida** Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre chère directeur de thèse, Professeur Madame **HASSAINE Hafida** de nous avoir encadrés tout au long de ce travail. Merci pour son soutien, son enseignement, ses précieux conseils, sa confiance et son aide durant tout notre parcours.

Nous désirons remercier profondément la doctorante **GAOUAR Sarah** pour ses précieux conseils, sa disponibilité, sa gentillesse, sa bonté, ses efforts et tout le temps qu'elle nous a consacré durant la réalisation de ce mémoire.

Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par :

Monsieur **REBIAHI Sid Ahmed** Maître de Conférences A, université de Tlemcen, qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

A Madame **BELLIFA Samia** Maître de Conférences B, université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un grand merci pour nos chers professeurs qui nous ont fait découvrir le monde de la Biologie et qui nous ont donné les bases de la recherche pendant notre parcours universitaire.

Merci aux personnes qui nous ont aidé et contribué à la réalisation de ce modeste travail. Et à tous ceux qui nous ont donné le courage et qui ont cru en nous.

Dédicace

Je dédie ce mémoire,

À mes très chers parents,

Pour leurs patiences, leurs amours, leurs soutiens, et leurs encouragements.

À mon très cher frère et à ma sœur.

À mon très cher fiancé.

À mon binôme Mina,

Avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

À toute ma famille.

Et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

À mes très chers parents,

Source de vie, de bonheur, d'amour et d'affection

*Je ne saurai point vous remercier comme il se doit, votre affection me couvre, votre
bienveillance me guide, vous êtes ma force pour affronter les obstacles de la vie*

Merci pour votre soutien et vos encouragements

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection

À ma famille,

Merci d'avoir toujours cru en moi

À mes précieuses amies,

Je n'oublierai jamais nos moments de joie et de folies passés ensemble

Merci d'être toujours à mes côtés

Merci pour vos conseils et votre soutien durant les moments difficiles

À mon binôme Samia,

Avec qui j'ai partagé chaque moment de ma vie dès notre rencontre

Merci pour tout

À toutes les personnes chères à mon cœur.

Mina

Table des matières

Introduction	2
Première partie : Synthèse bibliographique	3
Chapitre I : Contamination des dispositifs médicaux et formation de biofilm	4
Chapitre II : Microorganismes impliqués et biofilm sur dispositifs médicaux	6
1. Prédominance des microorganismes impliqués dans le biofilm.....	6
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
1.4. <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
1.5. <i>Escherichia coli</i>	8
1.6. <i>Proteus mirabiis</i>	8
1.7. <i>Candida albicans</i>	9
2. Étapes de formation du biofilm	11
2.1.Adhésion réversible	11
2.2.Adhésion irréversible	11
2.3.Formation de microcolonies	11
2.4.Maturation du biofilm	11
2.5.Dispersion du biofilm	12
3. Facteurs favorisant la formation de biofilm	12
3.1.Caractéristique de la surface	12
3.2.Caractéristique du milieu	13
3.3.Propriétés des cellules.....	13
4. Mécanismes régulateurs de formation de biofilm	13
4.1.Le quorum sensing	13
4.2.Régulation génétique par les cellules fixées	15
Chapitre III : Interactions microbiennes dans les biofilms	16
1. Interactions coopératives	16
2. Interactions compétitives	18
Chapitre IV: Mesures préventives et traitement des dispositifs médicaux	20
Deuxième partie : Matériel et méthodes	22
1. Lieu de travail	23

2. Provenance des souches	23
3. Revivification et réidentification des souches.....	23
4. Conservation des souches	23
5. Détection de la formation de biofilm chez les souches isolées sur différents supports	24
5.1.Cultures bactériennes	24
5.2.Détection de la formation de biofilm chez les souches : Technique du cristal violet	24
5.3.Test de révélation de biofilm	25
Troisième partie : Résultats et discussion.....	27
1. Résultats et caractérisation des souches.....	28
1.1.Caractéristiques des souches : Aspect macroscopique	28
1.2.Caractères biochimiques.....	30
2. Résultats de la formation de biofilm (mono et bi-espèces) des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> sélectionnées sur différents supports.....	31
2.1.Résultats sur la capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> sur trois supports différents	32
2.2.Résultats sur la capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur trois supports différents	36
2.3.Résultats sur la capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur trois supports différents	39
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	46
Annexes	54
Résumés	

Liste des abréviations

AHL	: Acyl Homosérine Lactone
AI	: Autoinducteurs
AIP	: Peptides auto-inducteurs
CAUTI	: Infections des voies urinaires associées aux cathéters
CV	: Cristal Violet
DM	: Dispositifs médicaux
EPS	: Substances polymérisées extracellulaire
ETT	: Tube endotrachéal / sonde endotrachéale
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
HQNO	: 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide
IAS	: Infections associées aux soins
LB	: Luria Bertani
MDR	: Multidrug resistant
MEC	: Matrice extracellulaire
Nm	: Nanomètre
PDT	: Thérapie photodynamique
Pel	: Pellicle locus
Psl	: Polysaccharide synthesis locus
QS	: Quorum sensing
QSM	: Quorum sensing molécule
SAM	: Monocouche auto-assemblée
VAP	: Pneumonie associée au ventilateur

Liste des figures

Figure 1	: Les étapes de formation du biofilm.....	12
Figure 2	: Protocole opératoire de la formation de biofilm mono et bi-espèces.....	26
Figure 3	: Aspect des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur gélose Cétrimide.....	28
Figure 4	: Aspect des colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Chapman.....	29
Figure 5	: Aspect des colonies de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur gélose Mac Conkey.....	29
Figure 6	: Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la galerie API 20E.....	30
Figure 7	: Identification de <i>Staphylococcus aureus</i> par la galerie API Staph.....	30
Figure 8	: Identification de <i>Klebsiella pneumoniae</i> par la galerie API 20E	31
Figure 9	: Croissance des souches en mono et bi-espèces de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> en bouillon LB sur différents supports	33
Figure 10	: Capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> sur différents supports	33
Figure 11	: Croissance des souches en mono et bi-espèces <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> en bouillon LB sur différents supports	36
Figure 12	: Capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur différents supports	37
Figure 13	: Croissance des souches en mono et bi-espèces de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> en bouillon LB sur différents supports	40
Figure 14	: Capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur différents supports	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les microorganismes trouvés sur les dispositifs et implants médicaux 10

Introduction

Les biofilms sont définis comme des communautés polymicrobiennes engluées dans une matrice et adhèrent à une surface biotique ou abiotique, ils représentent le mode de vie le plus abondant dans la nature. Les bactéries qui le composent dites sessiles expriment fréquemment des phénotypes différents de leurs homologues planctoniques. Les biofilms sont la source de problèmes majeurs dans de nombreux domaines alimentaires, dentaires mais également dans le domaine médical où plus de 60% des infections associées aux soins sont favorisées par la formation et la persistance des biofilms **(Hajoubi, 2019)**.

La formation de biofilm peut se faire sur n'importe quel dispositif médical, représentant ainsi un problème émergent dans le secteur de la santé publique en raison de la tolérance accrue à la thérapie antimicrobienne actuelle **(Puiu et al., 2017)**. L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser les surfaces telles que les implants médicaux invasifs. La plupart des biofilms sont multi-espèces et nécessitent donc des stratégies complexes de traitement antimicrobien.

Le développement du biofilm est rapide et inévitable sur la plupart des matériaux utilisés en médecine humaine telles les dispositifs médicaux en polypropylène, en polyéthylène, en verre ou autres **[(Espinasse et al., 2010) ; (Barakat et al., 2014) ; (Arciola et al., 2015)]**.

Les biofilms microbiens sont caractérisés par leur diversité, une densité cellulaire élevée et une proximité cellule-cellule étroite. Cela suggère que les cellules microbiennes dans les biofilms présentent probablement des interactions intermicrobiennes classées comme coopératives ou compétitives selon le type de comportement social et le mécanisme moléculaire. Elles contribuent à la formation d'une communauté hautement structurée, permettant aux cellules de mener des activités métaboliques qui peuvent améliorer la fonction globale de la communauté **[(Burmølle et al., 2014) ; (Li et al., 2016)]**.

Dans ce contexte, et en tenant compte que les conditions permettant la formation d'un biofilm mixte ne sont pas clairement établies, ce travail a pour objectif d'étudier *in vitro* la capacité de formation de biofilms mixtes (bi-espèces) en tubes, suivant la technique de coloration au cristal violet, entre trois bactéries d'intérêt médical à savoir *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* sur différents supports.

Première partie :

Synthèse

bibliographique

Chapitre I : Contamination des dispositifs médicaux et formation de biofilm

L'OMS estime qu'entre 5 et 30 % des patients hospitalisés contractent une ou plusieurs infections, causant une charge de morbidité et de mortalité extrêmement élevée, dont 10% de ces infections sont associées aux soins de santé (IAS) (**Adams *et al.*, 2010**). La plupart de ces dernières sont liées aux dispositifs médicaux (DM) qui constituent un point d'entrée majeur pour les microorganismes pathogènes formant un biofilm (**Mion *et al.*, 2019**).

Tout dispositif, implanté à titre provisoire ou permanent, peut devenir le site d'une éventuelle infection (sonde urinaire, sonde d'intubation, valve cardiaque, prothèse vasculaire ou orthopédique, cathéters, canaux d'endoscopes, tubulures d'hémodialyse, tubulures d'eau dentaire, etc....). Des biofilms peuvent se former à la surface ou à l'intérieur de ces dispositifs médicaux implantés dans l'organisme. Ceci pose un véritable problème de santé publique pour les personnes nécessitant ces implants (**Espinasse *et al.*, 2010**).

Les biofilms sont très répandus et se trouvent sur des surfaces humides, des dispositifs médicaux par exemple, les cathéters, les valves cardiaques artificielles, les stimulateurs cardiaques et les canaux de l'endoscope (**Ren-Pei *et al.*, 2014**).

Un biofilm est une communauté de micro-organismes assez complexe, c'est une structure vivante, dynamique, fixée à une surface biotique ou abiotique encapsulée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) produite par les membres de cette communauté [(**Seghir *et al.*, 2015**) ; (**Medeiros, 2016**)]. Il peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes on parle alors de biofilm homogène ou de biofilm hétérogène mixte (**Bezoui, 2016**).

Le biofilm protège les cellules et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles, il leur procure une résistance à la réponse immunitaire de l'hôte, aux antibiotiques et aux désinfectants (**Tremblay *et al.*, 2014**). Il est considéré comme une source permanente d'infections (environ 60% des infections humaines) car il agit comme une barrière et il est difficile à éliminer (**Amini *et al.*, 2016**).

Lors de l'implantation d'un matériel étranger, on considère que le risque d'adhérence bactérienne lié au geste chirurgical est majeur lors des six premières heures. Il s'engage alors une course de vitesse entre la prise en charge par le système immunitaire et la colonisation de la surface de l'implant par des bactéries à la suite d'une contamination préopératoire ou postopératoire précoce (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

Les microorganismes responsables proviennent de la flore cutanée du patient, de l'environnement ou de la microflore exogène transitoire véhiculée par le personnel hospitalier **(Seghir, 2015)**.

Les biofilms peuvent être composés d'une ou plusieurs espèces de microorganismes, selon le type de dispositif implanté et la durée d'implantation dans l'organisme du patient [(**Marino et al., 2017**) ; (**Cady, 2018**)]. Les principaux microorganismes sont des bactéries, y compris des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ou des levures tels : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Providencia rettgeri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, et *Candida albicans* [(**Bossa et al., 2017**) ; (**Cortese et al., 2018**)].

Chapitre II : Microorganismes impliqués et biofilm sur dispositifs médicaux

1. Prédominance des microorganismes impliqués dans les biofilms

Les biofilms ont une grande importance pour la santé publique en raison de leur rôle dans certaines maladies infectieuses et de leur importance dans diverses infections liées aux dispositifs. En fait, plus de 60% des complications liées à l'hôpital et jusqu'à 80% des décès liés à l'infection sont attribuables aux infections à biofilm, et près de 80% des bactéries pathogènes connues ont été impliquées dans des infections liées aux dispositifs. Ces infections, sont dues respectivement à des agents pathogènes multirésistants, représentant près de 26% et 22% de toutes les infections liées aux soins de santé. Les microorganismes tels que les corynébactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, les entérocoques, ainsi que les staphylocoques à coagulase négative, y compris les genres *Pseudomonas*, *Serratia* et *Acinetobacter*, sont le plus souvent associées aux infections chroniques associées aux dispositifs médicaux. Les souches résistantes peuvent développer de nouveaux mécanismes qui permettent aux bactéries d'être récalcitrantes envers les effets d'un large éventail d'antibiotiques [(Ramasmay et lee, 2016) ; (Anju et al., 2019) ; Srivastava et al., 2019)].

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Cette bactérie opportuniste à Gram négatif, produit de multiples facteurs de virulence et une couche dense d'EPS contenant jusqu'à trois exopolysaccharides différents (alginate, Pel et Psl). Cela fournit une barrière efficace contre les défenses de l'hôte, ce qui rend les biofilms difficiles à traiter et à éradiquer, d'autant plus qu'ils libèrent et dispersent également des cellules bactériennes pour coloniser de nouveaux sites dans l'hôte. La colonisation par *P. aeruginosa* des dispositifs médicaux facilite les infections nosocomiales secondaires; les biofilms sur les cathéters veineux centraux et les sondes endotrachéales (ETT) peuvent respectivement provoquer des infections transmissibles par le sang et une pneumonie associée au ventilateur (VAP) (Kurmo et al., 2020).

Il y a toujours un taux élevé d'échec des antibiotiques dans les infections à *P. aeruginosa* et un taux de mortalité et de morbidité élevé, malgré un traitement antibiotique adéquat (Maurice et al., 2018).

1.2. *Staphylococcus spp*

Les staphylocoques comprennent un genre diversifié d'organismes commensaux à Gram positif et non mobiles qui habitent la peau et les muqueuses des humains et d'autres mammifères. En général, les staphylocoques sont des membres bénins de la flore naturelle, mais de nombreuses espèces ont la capacité d'être des agents pathogènes opportunistes, infectant principalement les individus qui ont des implants de dispositifs médicaux ou sont autrement immunodéprimés. *S. aureus* et *S. epidermidis* sont une source majeure d'infections associées aux dispositifs médicaux telles que les infections liées aux cathéters intraveineux, aux stimulateurs cardiaques et aux implants mammaires. Dans les infections articulaires prothétiques, en particulier *Staphylococcus aureus* est en grande partie responsable des types d'infection post-interventionnelle précoces. La capacité des staphylocoques à former des biofilms *in vivo* les rend très résistants à la chimiothérapie et entraîne des maladies chroniques. Ces infections à biofilm comprennent l'ostéomyélite, l'endocardite et la persistance dans le poumon de la fibrose kystique [(Paharik et Horswill, 2016) ; (Hiltuneun et al., 2019)].

1.3. *Klebsiella spp*

Les espèces de *Klebsiella* sont considérées comme des pathogènes opportunistes colonisant les surfaces muqueuses sans provoquer de pathologie, cependant, à partir des muqueuses, *Klebsiella* peut se propager à d'autres tissus, provoquant des infections potentiellement mortelles, notamment la pneumonie, les infections urinaires, les infections du sang et la septicémie. Les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont la capacité de produire des biofilms qui persistent sur les surfaces abiotiques tels que les dispositifs à demeure et cela grâce à la production de fimbriae de type 1 et de type 3 et des pili communs d'*Escherichia coli* provoquant des infections nosocomiales. Le biofilm protège la bactérie des désinfectants, des antibiotiques et des attaques des réponses immunitaires de l'hôte près du site de contact entre le corps humain et les dispositifs à demeure [(Ostria-Hernandez et al., 2018) ; (Bengoechea et Sa Pessoa, 2019)].

1.4. *Acinetobacter baumannii*

La bactérie à Gram négatif *Acinetobacter baumannii* est un agent infectieux difficile à traiter, provoquant des infections nosocomiales dans le monde entier. Les caractéristiques de

ce pathogène opportuniste comprennent le phénotype de multirésistance (MDR), la capacité de résister à des conditions environnementales défavorables pendant de longues périodes et une forte propension à la propagation entraînant des épidémies hospitalières. Il est responsable de plus de 12% des cas d'infections sanguines nosocomiales, ainsi que des pneumonies. *A. baumannii* forme des communautés de biofilms sur la plupart des surfaces abiotiques; y compris, les équipements associés aux soins de santé tels que les tubes endotrachéaux ainsi que le polycarbonate et l'acier inoxydable. Il est bien considéré que les bactéries au sein des communautés de biofilms, y compris *A. baumannii*, ont une tolérance accrue aux contraintes extracellulaires. Comme pour de nombreux organismes producteurs de biofilm, les appendices de surface, les adhésines et les structures de surface protectrices, comme les polysaccharides capsulaires, contribuent grandement à la formation et au maintien des biofilms [(Harding *et al.*, 2018) ; (Garnacho-Montero et Timsit, 2019) ; (Skerniškytė *et al.*, 2019)].

1.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif, connue comme étant très polyvalente, elle peut exister comme commensal inoffensif dans le côlon mammifère ou comme pathogène causant une morbidité et une mortalité importantes dans le monde entier. Certaines souches d'*E. coli* sont principalement responsables de diverses infections associées aux dispositifs médicaux, telles que les cathéters urétraux et intravasculaires et les greffes prothétiques. Ces infections sont difficiles à éradiquer en raison de la formation de biofilms, comme exemple : les infections des voies urinaires associées aux cathéters (CAUTI) sont l'une des infections nosocomiales les plus fréquentes [(Sharma *et al.*, 2016) ; (Schiebel *et al.*, 2017)].

1.6. *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis, une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet plus connue pour sa motilité grouillante et son activité uréase, elle provoque fréquemment des infections des voies urinaires associées aux cathéters (CAUTI) qui sont exacerbées par la formation de biofilms sur les cathéters ou de communautés multicellulaires entourées d'une matrice de macromolécules telles que le polysaccharide, la protéine et l'ADN extracellulaire. La puissante activité uréase de *P. mirabilis* en particulier conduit à des biofilms cristallins, qui peuvent bloquer le flux du cathéter et sont supposés protéger les cellules dans l'armure

cristalline, les rendant difficiles à éradiquer [(Norsworthy et Pearson, 2017) ; (Armbruster et al., 2018)].

1.7. *Candida albicans*

C. albicans produit des biofilms hautement structurés composés de plusieurs types de cellules (c'est-à-dire des cellules rondes en forme de levure ; des cellules pseudohyphales ovales; et des cellules hyphales cylindriques allongées) enfermées dans une matrice extracellulaire). Représentant 15% de tous les cas de septicémie d'origine hospitalière, ils sont la quatrième cause la plus fréquente d'infections sanguines en milieu clinique et sont les espèces fongiques prédominantes isolées des infections des dispositifs médicaux. Les cathéters urinaires et veineux centraux, les stimulateurs cardiaques, les valves cardiaques mécaniques, les prothèses articulaires, les lentilles de contact et les prothèses dentaires sont tous sensibles aux biofilms de *C. albicans* (Nobile et Johnson, 2015).

**Tableau 1 : les microorganismes trouvés sur les dispositifs et implants médicaux
(Srivastava *et al.*, 2019).**

Nombre	Dispositifs médicaux	Microorganismes formant le biofilm
1	Prothèses vocales artificielles	<i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> ,
2	Stimulateurs cardiaques	<i>S. aureus</i>
3	Cathéters veineux centraux	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i>
4	Lentilles de contact	<i>P. aeruginosa</i> et les cocci à Gram positif
5	Implants dentaires	Cocci à Gram positif acidogènes (ex : <i>Streptococcus</i>) Bactéries orales anaérobies à Gram négatif
6	Tubes endotrachéaux	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> ,
7	Implants orthopédiques	<i>Hemolytic streptococci</i> , <i>Enterococci</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Bacteroides sp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>
8	Cathéters de dialyse péritonéale	<i>Streptococci</i> , <i>Staphylococci</i>
9	Valvules cardiaques prothétiques	<i>Streptococcus viridans</i> , <i>staphylocoques</i> à coagulase négatif, <i>Enterococci</i> , <i>S. aureus</i>
10	Plaies chirurgicales, infections liées aux prothèses	<i>Candida</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
11	Cathéters urinaires	<i>S. epidermidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>P. mirabilis</i>

2. Étapes de formation du biofilm (Figure 1).

2.1. Adhésion réversible

En premier lieu, il y a la formation d'une couche de conditionnement qui est nécessaire à l'attachement microbien. Elle est composée de nombreuses particules organiques ou inorganiques et se dépose sur la surface du support sur lequel va s'établir le biofilm (Baudin, 2017).

Les bactéries vont s'adhérer de manière réversible et transitoire à une surface biotique ou abiotique par des liaisons faibles [(Tremblay *et al.*, 2014) ; (Khatoun *et al.*, 2018)]. L'adhérence à la surface est conditionnée par les caractéristiques physicochimiques de la bactérie telles que la charge électrostatique et l'hydrophobie (Lebeaux et Ghigo, 2012).

2.2. Adhésion irréversible

Les microorganismes vont ensuite se fixer de manière ferme et durable sur le support en multipliant les liaisons faibles (type liaisons de van der Waals, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes) dont le nombre compense le niveau d'énergie à l'aide de divers appendices, flagelles, pili et les EPS secrétées par ces cellules (Saur, 2014).

2.3. Formation de microcolonies

Cette étape est caractérisée par la prolifération des bactéries qui donne lieu à la formation des micro-colonies. La formation de ces dernières est un mécanisme d'agrégation cellulaire (Lattab, 2018).

2.4. Maturation du biofilm

Les cellules bactériennes sécrètent des substances exopolymériques (EPS) qui vont permettre de les immobiliser et les maintenir à proximité les unes des autres. Ce stade implique l'intervention du QS. Les premières microcolonies sont formées par des cellules non mobiles qui prolifèrent à des positions fixes et forment la base du biofilm. La sous-population mobile migre alors, à l'aide de flagelles et pili de type IV, et colonise la base du biofilm pour former la périphérie de la structure. Au cours de l'accumulation des exopolymères synthétisés par les bactéries, la matrice extracellulaire (MEC) gagne en épaisseur. Elle se creuse des canaux qui permettent l'apport des nutriments et de l'oxygène dans les différentes couches du biofilm et l'export des différents déchets produits dans l'environnement [(Lattab, 2018) ; (Roy *et al.*, 2018)].

2.5. Dispersion du biofilm

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, il subit des phénomènes de dispersion (**Bezoui, 2016**). Il peut alors libérer des bactéries isolées ou des fragments de biofilm qui pourront à leur tour former de nouveaux biofilms sur d'autres surfaces (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

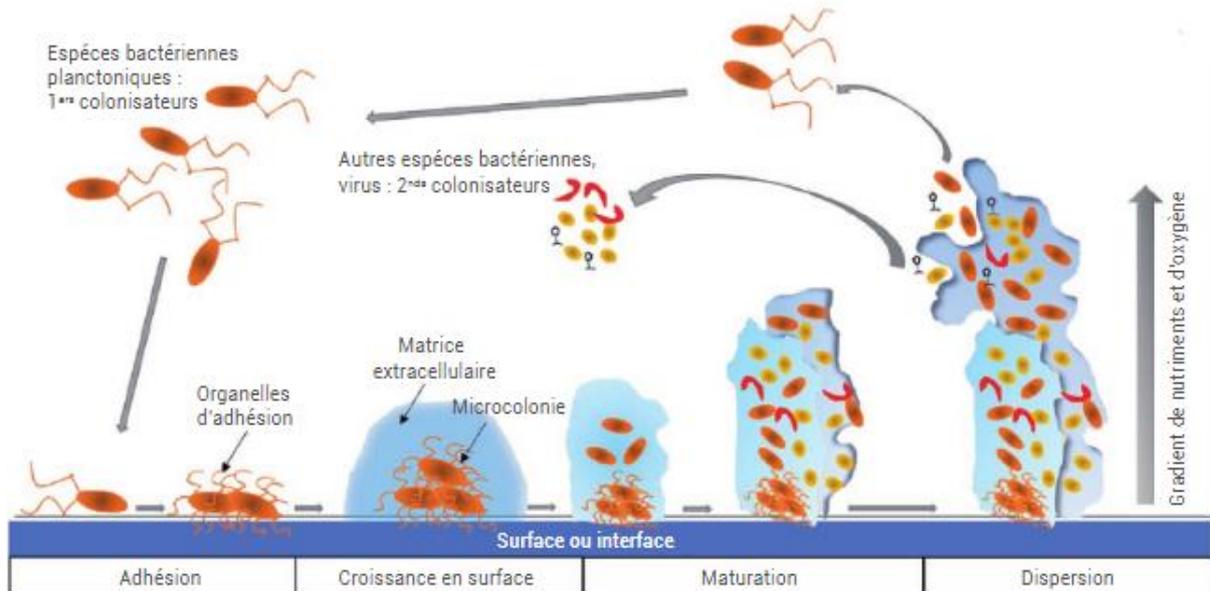


Figure 1 : Les étapes de formation du biofilm (**Douarche et al., 2018**).

3. Facteurs favorisant la formation biofilm

Un certain nombre de facteurs tels que les effets du substrat, l'hydrodynamique et diverses propriétés de la surface cellulaire, son conditionnement, le type du milieu de croissance, la température, le pH, les interactions électrostatiques et physiques entre les cellules bactériennes et la surface, la communication cellule-cellule et la signalisation, sont des facteurs qui peuvent influencer l'adhérence bactérienne et le développement ultérieur du biofilm [(**Didouch, 2015**) ; (**Sarjit et al., 2015**) ; (**Choudhary et al., 2020**)].

3.1. Caractéristiques de la surface

La fixation des micro-organismes à la surface est un phénomène complexe, la surface peut avoir plusieurs caractéristiques, la formation du « biofilm » semble augmenter à mesure que la rugosité de surface augmente, et les propriétés physico-chimiques comme (la balance hydrophile/hydrophobe, la densité de la charge, et la perméabilité hydrodynamique) occupent un rôle important dans l'adhésion initiale des bactéries (**Benmahdi, 2017**).

3.2. Caractéristiques du milieu

L'effet du pH a un rôle intrinsèque dans la croissance bactérienne, la gamme optimale dépend du type de bactéries, si le pH diffère de la gamme optimale, il peut entraver la croissance et entraîner la mort bactérienne et par conséquent l'arrêt de la formation de biofilm. La température est aussi un facteur essentiel qui affecte la vitesse de réaction enzymatique dans le métabolisme bactérien car il est directement associé aux enzymes (Achinis *et al.*, 2019).

L'attachement des micro-organismes à une surface prend en compte un grand nombre de variables comme :

- ✓ Vitesse du flux.
- ✓ Présence d'un flux laminaire ou non.
- ✓ pH, température.
- ✓ Disponibilité du milieu en oxygène et la présence d'agents antimicrobiens.
- ✓ La force ionique
- ✓ Cations (calcium Ca^{2+} , sodium Na^{+} , fer ferrique Fe^{3+} , lanthane Ln^{3+} ...), le fer, le phosphore et l'azote.
- ✓ Les nutriments, les micronutriments et la source de carbone [(Clutterbuck *et al.*, 2007) ; (Didouch, 2015) ; (Choudhary *et al.*, 2020)].

3.3. Propriétés des cellules

L'adhérence des cellules bactériennes à des surfaces est une stratégie importante pour leur survie. Une fois que les biofilms sont formés dans un système aqueux, chaque membre du biofilm a été choisi par ses propriétés de surface de cellule comprenant la présence « des capsules, des fimbriae, et de l'hydrophobicité de la cellule ». L'hydrophobicité de la cellule est due à des composés liés à la membrane externe et à la production d'exopolysaccharides. Elle varie également avec la température et le stade de croissance. En effet la présence du flagelle chez la bactérie influence la formation de biofilm dans le transport et dans les interactions initiales de cellule-surface (Didouch, 2015).

4. Mécanismes régulateurs de formation de biofilm

4.1. Le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication et de perception utilisé par les bactéries. Il permet une adaptation coordonnée d'une population bactérienne aux changements environnementaux. Il se fonde sur la production de petites molécules, les

autoinducteurs (AI), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule. Les AI, dont la concentration est proportionnelle au nombre de bactéries, servent d'indicateur moléculaire de la densité bactérienne. À partir d'une certaine concentration de ces molécules, une réponse cellulaire est enclenchée par l'activation et la répression de gènes efficaces seulement lorsque la densité cellulaire est importante, pour mettre en place des phénotypes particuliers, comme la formation de biofilm [(Gellatly et Hancock, 2013) ; (Seghir *et al.*, 2017) ; (Mion *et al.*, 2019)].

Les molécules signal du quorum-sensing sont de nature chimique différente selon le type de bactéries. Elles sont classées en trois classes. Les molécules AHL (Acyl Homosérine Lactone) aussi appelé auto-inducer 1 (AI-1) sont produites par les bactéries à Gram négatif. Elles sont le senseur du système LuxI/LuxR. La deuxième classe est le système LuxS qui met en jeu une molécule signal auto-inducer 2 (AI-2). Cette molécule a été découverte chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, elle joue un rôle important dans la formation de biofilm mixte (Pantaleon, 2015).

Chez les bactéries à Gram négatif, le QS est contrôlé par un système à deux composants intégrés par une synthase (LuxI), responsable de la production de la QSM N-acyl-homosérine-lactone (AHL), et un récepteur capteur (LuxR), responsable de la détection de la molécule dans l'environnement. Les quinolones ont été trouvées comme QSM dans d'autres bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa*. Puis, des mécanismes du QS médiés par des peptides et l'auto-inducteur 2 (AI-2) ont été découverts dans des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (Barriuso, 2015).

Les bactéries à Gram positif utilisent de petits peptides modifiés de manière post-traductionnelle, ce sont des peptides auto-inducteurs (AIP) utilisés comme des molécules de signalisation, ces dernières représentent la troisième classe du QSM. Les AIP font souvent partie intégrante d'un système de transduction de signaux à deux composants histidine kinase. Dans certains cas, les AIP sécrétés peuvent être réimportés dans la cellule après leur libération. Ils sont ensuite identifiés par des facteurs de transcription cytoplasmiques. Dans ce système, les protéases extracellulaires transforment le précurseur-AIP sécrété en AIP mature. À leur retour dans la cellule, les AIP matures se lient et modifient l'activité des facteurs de transcription correspondants. On sait que certains exemples d'un tel transport sont essentiels à la sporulation, à la compétence et à la production d'enzymes chez *Bacillus subtilis* (Bhatt, 2018).

4.2. Régulation génétique par les cellules fixées

Après fixation sur un substrat, l'expression d'un certain nombre de gènes est régulée par les cellules fixées. Cette régulation génétique peut être de deux types « inhibiteur ou stimulateur ». Elle va entraîner une modification phénotypique des bactéries résultant la formation d'un biofilm (**Bezoui, 2016**).

Chapitre III : Interactions microbiennes dans les biofilms

Les interactions microbiennes conduisent à la formation de complexes bactériens, dans de nombreux cas constitués de plus de 50 espèces différentes de bactéries en un seul endroit. La communication chimique entre les bactéries est essentielle pour la coexistence stable des différentes espèces au sein de biofilm (**Houvion, 2014**).

La diversité des espèces, la densité cellulaire élevée et la proximité des cellules sont typiques de la vie dans les biofilms, où les microorganismes interagissent entre eux et développent des interactions complexes qui peuvent être soit compétitives soit coopératives. Ces dernières sont omniprésentes dans les biofilms multispécifiques et jouent un rôle important dans le maintien de la diversité et de la stabilité des communautés microbiennes (**Li et Tian, 2016**).

1. Interactions coopératives

Les biofilms sont des communautés microbiennes coopératives composées d'une ou de plusieurs espèces, ancrées à une surface, et protégées contre les risques environnementaux par une matrice extracellulaire sécrétée. Ils se trouvent dans l'environnement naturel et artificiel. Les biofilms protègent également les micro-organismes des antibiotiques et peuvent donc causer des infections persistantes. Les biofilms sont obligés à produire des biens comme les personnes, tels que les composants de la matrice extracellulaire, qui peuvent être utilisés par tous les membres. Comme toutes les communautés coopératives, ils sont sensibles aux «tricheurs» qui ne produisent pas les biens publics, encore en tirer profit. En dépit de leur vulnérabilité face aux tricheurs individuels, les biofilms sont omniprésents et stables (**Deschaine et al., 2018**).

Dans les interactions bactériennes de coopération, la formation de biofilm se produit en facilitant l'adhérence, la croissance et la protection contre les biocides (**Alonso et al., 2020**).

Dans ces conditions complexes, les bactéries pourraient bénéficier de la division du travail, des actions collectives, et d'autres formes d'activités de coopération avec leurs voisins. Par exemple, la plaque dentaire est une communauté biofilm bien reconnue caractérisée par sa grande biodiversité (> 700 espèces) et de haute densité cellulaire (10^{11} cellules / g de poids humide). Ce qui crée un environnement propice et inévitable aux interactions intra et inter-espèces (**Li et Tian, 2012**).

Dans le cas de ces interactions, il a été démontré par **Burmølle et al. (2014)** qu'*E. coli* ne produit pas de biofilm lorsqu'elle est inoculée seule, mais qu'elle a pu établir un biofilm pré ou colonisé par *P. aeruginosa*. Dans cette étude, les examens spatiaux ont révélé que les microcolonies d'*E. coli* étaient principalement situées à proximité des cellules, de *P. aeruginosa* qui ont déjà colonisé la surface en la modifiant et ainsi faciliter la fixation par *E. coli*.

Les interactions coopératives conduisent à une organisation spatiale spécifique de différentes espèces dans les biofilms, ce qui assure en outre un chemin d'accès de diffusion efficace pour les composés organiques (**Yang et al., 2011**).

Un autre mécanisme par lequel les espèces d'un biofilm mixte coopèrent pour survivre dans des environnements hostiles implique un membre fournissant des conditions qui favorisent la survie des autres membres. Par exemple, les bactéries anaérobies sont sensibles à l'oxygène, mais sont capables de survivre et de persister dans des conditions aérobies lorsqu'elles sont cultivées en présence de bactéries aérobies dans un biofilm mixte. Leur survie est rendue possible car les bactéries aérobies consomment l'oxygène et fournissent ainsi des conditions anaérobies dans les couches profondes du biofilm dans lesquelles les bactéries anaérobies peuvent se multiplier. Une autre façon dont les espèces d'un biofilm mixte coopèrent pour survivre dans des conditions difficiles est supposée impliquer un membre induisant des changements transitoires de résistance chez les voisins proximaux. Par exemple, *S. mutans* survit plus efficacement à divers agents antibactériens lorsqu'elle est présente dans un biofilm mixte avec *Veillonella parvula* contrairement au biofilm mono-espèce. L'analyse de transcription a révélé que *V. parvula* induisait des changements dans l'expression des gènes chez *S. mutans*. À la lumière de cette constatation, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une espèce résidant dans un biofilm mixte peut modifier considérablement la physiologie et améliorer la résistance aux antibiotiques des espèces voisines. Les interactions coopératives entre différentes espèces peuvent favoriser la survie et la croissance du biofilm d'une ou plusieurs espèces voisines dans des conditions difficiles, telles que des agents antibiotiques, des environnements hostiles, des organismes envahisseurs et des réponses immunitaires de l'hôte. Les mécanismes sous-jacents à la coopération sont divers et comprennent la modification de la composition de la matrice EPS, la réduction de l'hostilité de l'environnement et l'induction des changements de d'expression chez les voisins proximaux (**Elias et Banin, 2012**).

2. Interactions compétitives

Au sein des biofilms, la compétition écologique est souvent intense, en particulier parmi les souches dont les besoins nutritionnels se chevauchent. La compétition écologique comprend tous les effets négatifs d'une cellule sur la forme physique d'autres cellules, qui peuvent résulter d'adaptations évolutives pour nuire à d'autres génotypes. Un certain nombre d'études ont montré que la présence de concurrents peut inciter les bactéries à produire plus de biofilm, modifier la quantité d'antimicrobiens qu'elles sécrètent ou devenir plus tolérantes aux antibiotiques (**Lories *et al.*, 2020**).

La concurrence pour les éléments nutritifs et d'autres paramètres de croissance est certainement une force motrice importante pour le développement de la structure de biofilm, la densité cellulaire accrue favorise des signaux chimiques pour communiquer avec les cellules répondantes pour les interactions sociales dans les biofilms. De nombreuses bactéries dans les biofilms dentaires produisent des bactériocines peptides, qui peuvent jouer un rôle important dans la concurrence entre les espèces, la biodiversité et l'adaptation écologique des micro-organismes (**Li et Tian, 2012**).

Les interactions *in vitro* entre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont compétitives et entraînent l'éradication de *S. aureus*. Cependant, il a été signalé que lors de la colonisation polymicrobienne de *P. aeruginosa* et *S. aureus*, le *P. aeruginosa* n'inhibe pas complètement la colonisation de *S. aureus*, celle-ci utilise plutôt de nombreuses stratégies de défense pour sa survie dans la même niche écologique et se développe et émerge comme une variante de petite colonie, une souche morphologiquement altérée mais plus résistante aux antibiotiques que la souche de *S. aureus* normale (**Yadav *et al.*, 2017**).

Les interactions compétitives peuvent se produire dans le conflit pour l'espace, les nutriments, et les sources d'énergie (concurrence d'exploitation), soit en raison de la production de composés secondaires tels que des bactériocines, des enzymes, du peroxyde d'hydrogène, et les acides organiques (concurrence d'interférence), ce qui favorise l'exclusion compétitive bactérienne contre *L. monocytogenes* et *B. cereus*. L'espèce *Janthinobacterium* inhibe l'adhérence et la formation de *L. monocytogenes* en biofilms mixtes, montrant que les propriétés antilisteriales peuvent avoir un impact microbiome dans les installations de transformation des aliments. Plusieurs espèces de Bacille sont également des producteurs d'une variété de composés antimicrobiens (les peptides, les lipopeptides, les bactériocines) contre les bactéries et les champignons. Dans une étude récente, l'utilisation de *B. cereus* (AR156) en présence de la bactérie *Ralstonia solanacearum* et du nématode *Meloidogyne incognita* a été efficace contre les maladies des plantes (**Alonso *et al.*, 2020**).

Les substances toxiques sont sécrétées par de nombreuses espèces microbiennes pour tuer ou inhiber la croissance d'autres espèces. Par exemple, *P. aeruginosa* est rapporté à éliminer les *Candidas* dans les biofilms multi-espèces en utilisant des facteurs de virulence qui sont bien caractérisées dans les infections humaines. **Tong et al. (2008)** ont rapporté que *Streptococcus oligofermentans* utilise L-amino oxydase acide pour générer du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et supprimer la croissance des *S. mutans* dans un biofilm multi-espèces. **Rao et al. (2005)** ont rapporté que la bactérie marine *Pseudoalteromonas tunicier* produit une protéine antibactérienne qui inhibe la croissance d'autres bactéries marines isolées à partir du même environnement (**Yang et al., 2011**).

Les interactions métaboliques compétitives entre les espèces jouent souvent un rôle essentiel dans le façonnement de la structure et de la fonction des communautés multispécifiques. **Scheffer et van Nes. (2006)** ont démontré que la ségrégation auto-organisée des espèces dans les communautés est un effet direct des interactions compétitives, en utilisant un modèle basé sur la théorie classique de la concurrence (**Liu et al., 2016**).

Les interactions entre les espèces au sein d'un biofilm mixte sont influencées par plusieurs facteurs, notamment la production d'agents antibactériens, les besoins métaboliques et les conditions environnementales. Tout changement dans un ou plusieurs de ces facteurs peut avoir un impact considérable sur la structure et la dynamique de la communauté des biofilms. Bien que la plupart des biofilms multi-espèces présentent une augmentation de la résistance aux antibiotiques par rapport aux biofilms mono-espèces, la compétition au sein d'un biofilm mixte peut occasionnellement entraîner une sensibilité accrue du biofilm mixte aux agents antimicrobiens. Par exemple, un biofilm mixte comprenant deux bactéries entériques *Enterobacter agglomerans* et *Enterobacter gergoviae* s'est avéré être de plus petite taille et plus sensible aux agents antimicrobiens que celui formé par chaque bactérie seule. Il semble probable que, comme les deux espèces produisent des bactériocines susceptibles d'avoir un impact sur les autres espèces, l'ajout d'un agent antimicrobien externe représente un lourd fardeau (**Elias et Banin, 2012**).

Chapitre IV : Mesures préventives et traitement des dispositifs médicaux

Les dispositifs médicaux (DM) contaminés par des agents pathogènes peuvent être à l'origine d'infections humaines, dans le cas d'un DM réutilisable, des mesures doivent être prises avant l'application au patient suivant afin que les agents pathogènes ne puissent pas être transmis. Ces procédures comprennent généralement le nettoyage, la désinfection et la stérilisation. Afin de placer le DM dans un état exempt de micro-organismes ou stérile après utilisation, sa préparation doit être sélectionnée comme prévu et réalisée avec des procédures validées (**Presterl, 2019**).

Cependant, de tels traitements ne sont pas totalement efficaces car les microorganismes formant le biofilm ont des caractéristiques qui offrent des conditions de vie microbienne réussies, y compris une résistance accrue aux traitements antibiotiques et biocides. Par conséquent, au cours des vingt dernières années, les études sur le terrain ont porté sur l'élaboration de stratégies préventives plutôt que sur des approches qui tuent les micro-organismes après leur colonisation en surface (**Cattò et Cappitelli, 2019**).

Les approches préventives actuelles (et dans une certaine mesure thérapeutique) peuvent être divisées en deux grandes catégories, les revêtements de surface ou l'éluotion, et les approches physiques / mécaniques / électriques / biologiques :

1. La modification de la surface des dispositifs médicaux utilisant des antibiotiques et imprégnés d'argent a fait l'objet de nombreuses recherches pour réduire la colonisation microbienne et la formation de biofilm tels que :

- Les cathéters de minocycline-rifampicine, cathéters chlorhexidine-sulfadiazine d'argent diminuent la colonisation microbienne des surfaces.
- Une sonde endotrachéale imprégnée d'argent (ETT) a montré un effet maximal au cours des 10 premiers jours d'intubation et une mortalité réduite chez les patients atteints de pneumonie respiratoire (VAP).

2. Les surfaces avec des monocouches auto-assemblées (SAM), des brosses en polymère et des revêtements en polymère sont une méthodologie rentable et efficace pour prévenir la liaison cellulaire sur ces surfaces.

3. Utilisation de revêtements comprenant certains mélanges cationiques, d'une manière similaire aux polymères, anticipent l'agencement du biofilm en tuant ou en empêchant les micro-organismes après leur adhérence à une surface. Leur mode de fonctionnement est en grande partie lié aux changements de porosité du film ou aux perturbations des couches dans les cellules.

4. Des jets d'eau et des jets ont été utilisés comme approches physico-mécaniques pour l'élimination du biofilm (par exemple, débridement du site chirurgical, des exsudats ou des biofilms dentaires).
5. La thérapie photodynamique (PDT) a des applications potentielles dans la prévention des infections du biofilm de la plaie. Un colorant photoactif est utilisé suivi d'une irradiation en présence d'oxygène, tuant ainsi les bactéries.
6. La thérapie bactériophage : Ces derniers sont capables d'infecter et de tuer les bactéries sensibles aux antibiotiques et résistantes.
7. Une autre stratégie de soulèvement consiste à utiliser des molécules anti-biofilm efficaces ou des substances dissolvant le biofilm qui interfèrent avec les voies de signalisation bactériennes chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces molécules peuvent être n'importe quelle enzyme, un peptide, un antibiotique, des polyphénols, etc...
8. Le quorum quenching offre la possibilité de limiter la formation de biofilm, la tolérance aux antimicrobiens et la virulence des microorganismes.
9. Enfin, des stratégies électriques et électrochimiques sont en cours de développement pour leurs activités anti-biofilm [(Wu *et al.*, 2015) ; (Roy *et al.*, 2018) ; (Wi et Patel, 2018) ; (Mion *et al.*, 2019) ; (Srivastava *et al.*, 2019)].

Un traitement à long terme avec des doses élevées et utilisant souvent une combinaison d'antibiotiques avec différents mécanismes de destruction peut parfois éliminer l'infection. Cependant, en cas de difficultés thérapeutiques si un corps étranger est impliqué, l'enlèvement du matériel est dans la plupart des cas nécessaire pour un résultat réussi. Dans d'autres cas, seule une réduction du biofilm est possible, suivie d'un traitement suppressif du biofilm chronique ou en attendant que le biofilm rechute avec une exacerbation [(Lebeaux et Ghigo, 2012) ; (Wu *et al.*, 2015) ; (Wi *et al.*, 2018)].

Deuxième partie :
Matériel et méthodes

1. Lieu du travail

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement « LAMAABE » de l'Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

2. Provenance des souches

Dans cette étude, nous avons travaillé sur une collection de souches provenant du laboratoire « LAMAABE » Equipe 2, soit des souches de : *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, toutes bonnes formatrices de biofilm. Ces souches ont été isolées à partir des prélèvements sur dispositifs médicaux retirés de patients hospitalisés plus de 48h de différents services du CHU de Tlemcen. L'isolement, l'identification et la conservation ont eu lieu au sein du laboratoire « LAMAABE ».

3. Revivification et réidentification des souches

La confirmation de l'identification des souches était réalisée, après la vérification de leur pureté par :

- Étude des caractères macroscopiques : taille, forme, couleur et aspect.
- Étude des caractères microscopiques : Gram, morphologie, arrangement des cellules.
- Étude des caractères biochimiques : plaque API 20E et API Staph (Biomérieux®, France).

La plaque API est un ensemble de tubes permettant l'identification des bactéries par réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés.

Cette technique consiste à inoculer dans les microtubes une suspension homogène qui reconstitue les milieux déshydratés. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

4. Conservation des souches

Les souches ont été conservées en double réplique sur gélose nutritive inclinée à +4°C et dans le glycérol (50%) à -80°C.

5. Détection de la formation de biofilm chez les souches isolées sur différents supports

5.1. Cultures bactériennes

Pour la réalisation des tests de formation de biofilm, chacune des trois souches a été prélevée de son milieu sélectif : *Pseudomonas aeruginosa* à partir du milieu Cétrimide, *Staphylococcus aureus* à partir du milieu Chapman et *Klebsiella pneumoniae* à partir du milieu Mac Conkey. Puis ensemencées dans trois flacons contenant chacun 100 mL de bouillon Luria Bertani (LB) (**Annexe 2.1**). Après 24h d'incubation sous agitation à 37°C, les suspensions bactériennes sont ajustées à une densité optique (DO) de 0,20 à 580 nm par un spectrophotomètre.

Un volume maximal de 2 mL issu de ces trois suspensions bactériennes a été ensemencé dans divers tubes selon la méthode suivante.

5.2. Détection de la formation de biofilm des souches : Technique du cristal violet

Chez les souches cliniques *P. aeruginosa* (PA), *S. aureus* (SA) et *K. pneumoniae* (KP), la technique utilisée est la méthode standard de coloration au Cristal Violet (CV) en tubes [(**Djordjevic et al., 2002**) ; (**Metzler, 2016**)]. Cette technique permet une évaluation quantitative de la formation de biofilm, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du biofilm formé (**Vieu, 2014**). Elle peut être également utilisée afin d'étudier la formation de biofilms multi-espèces (biofilms mixtes).

- Formation de biofilm mono-espèces (constitué d'une seule bactérie):

Des tubes en verre, en polypropylène et en polyéthylène ont été inoculés avec 2 mL de la suspension PA (Biofilm à 100 % PA), des tubes de 2 mL de la suspension SA (Biofilm à 100 % SA) et d'autres 2 mL de la suspension KP (Biofilm à 100 % KP).

- Préparation de biofilm multi-espèces (association entre deux bactéries) :

Des biofilms mixtes ont été formés après une association entre les bactéries soit [(*P. aeruginosa* et *S. aureus*) ; (*S. aureus* et *K. pneumoniae*) ; (*P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*)].

Trois tubes de composition différente ont été employés comme support d'adhésion bactérienne et de formation de biofilm : des tubes en verre de 5 mL, des tubes en polypropylène de 15 mL et des tubes en polyéthylène de 2 mL.

- Biofilm (PA)-(SA)

Des tubes en verre, en polypropylène et en polyéthylène ont étéensemencés avec 1 mL de la suspension PA et 1 mL de la suspension SA (50 % PA / SA). De la même manière d'autres tubes ont été inoculé avec 1,5 mL de la suspension PA et 0,5 mL de la suspension SA (75 % PA / 25 % SA). Enfin, d'autres tubes ont étéensemencés avec 0,5 mL de la suspension PA et 1,5 mL de la suspension SA (25 % PA / 75 % SA).

- Biofilm (SA)-(KP)

De la même manière que précédemment, des tubes ont étéensemencés avec 1 mL de la suspension SA et 1 mL de la suspension KP (50 % SA / KP). D'autres ont été inoculé avec 1,5 mL de la suspension SA et 0,5 mL de la suspension KP (75 % SA / 25 % KP). Au même moment d'autres ont étéensemencés avec 0,5 mL de la suspension SA et 1,5 mL de la suspension KP (25 % SA / 75 % KP).

- Biofilm (PA)-(KP)

La même méthodologie a été appliqué pour cette combinaison afin d'avoir des tubes à (50 % PA / KP), des tubes à (75 % PA / 25 % KP) et d'autres à (25 % PA / 75 % KP).

Une incubation sans agitation de tous les tubes à 37°C pendant 24h a été réalisée.

5.3. Test de révélation de biofilm

Après l'incubation et pour chaque tube, l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 580 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Après, chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et rincé trois fois à l'eau distillée (ED), puis séché.

Le biofilm fixé sur les parois du tube est révélé après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de CV à 1 % (m/v) (**Annexe 2.2 / 2.3 / 2.4**). Après un temps de contact d'une heure, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'ED (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes). Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre.

Le CV fixé sur les parois des tubes est solubilisé par une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75/25). Après 1h, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

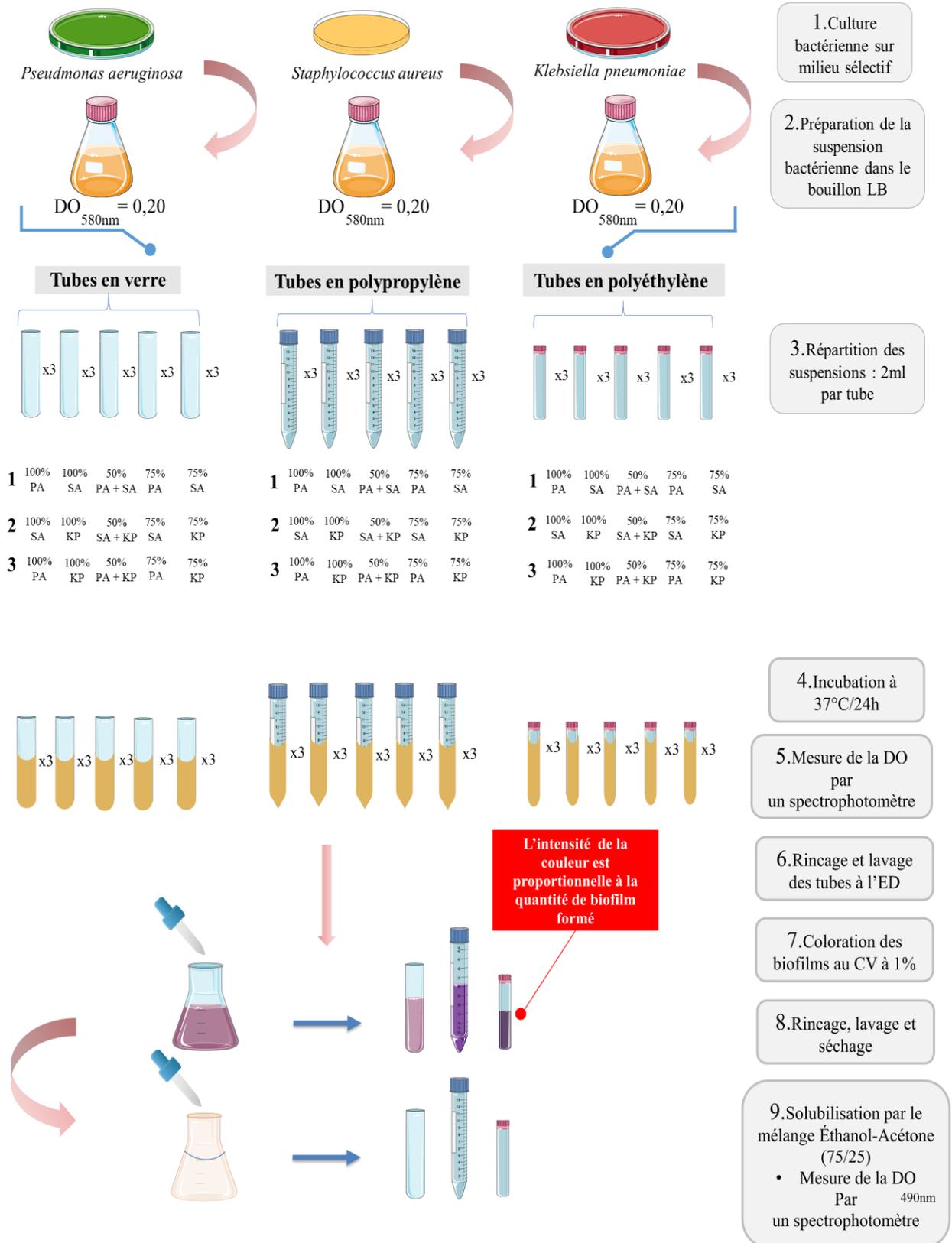


Figure 2 : Protocole opératoire de la formation de biofilm mono et bi-espèces.

Troisième partie :
Résultats et discussion

Ce travail a été effectué au laboratoire « LAMAABE » de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de La Terre et de L'univers à l'Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

Pour cette partie des souches isolées de dispositifs médicaux et bonnes formatrices de biofilm ont été sélectionnées d'une collection appartenant à l'équipe 2.

1. Résultats et caractérisation des souches

1.1. Caractères bactériologiques des souches : Aspect macroscopique

- *Pseudomonas aeruginosa*

Sur le milieu Cétrimide et après 24h d'incubation à 37°C, l'étude bactériologique nous a permis d'identifier des colonies de quelques millimètres de diamètre, plates ou surélevées, opaques, limitées par un bord régulier, prenant en vieillissant des reflets métalliques, présentant une pigmentation caractéristique bleue ou bleu-vert due à la sécrétion de la pyocyanine, accompagnée d'une odeur caractéristique de seringa (**Figure 3**).

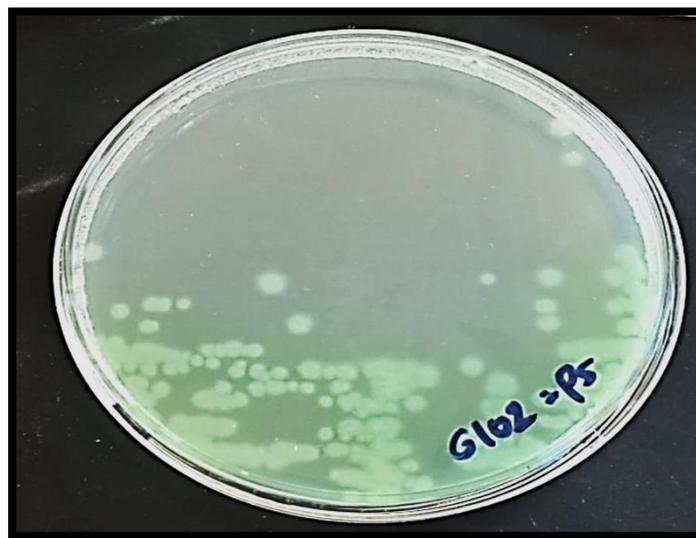


Figure 3 : Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Cétrimide.

- *Staphylococcus aureus*

Sur le milieu Chapman et après 24h d'incubation à 37°C, l'étude bactériologique nous a permis d'identifier des colonies de petite taille, rondes et lisses qui apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, elles sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm (**Figure 4**).



Figure 4 : Aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman.

- *Klebsiella pneumoniae*

Sur le milieu Mac Conkey et après 24h d'incubation à 37°C, l'étude bactériologique nous a permis d'identifier des colonies ayant un diamètre de 3 à 4 mm, lisses, lactose positif, bombées, brillantes, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine (**Figure 5**).



Figure 5 : Aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur gélose Mac Conkey.

1.2. Caractères biochimiques

- *Pseudomonas aeruginosa*

L'identification bactérienne par le système API 20E a permis de caractériser et de confirmer la souche de *P. aeruginosa* (Figure 6).

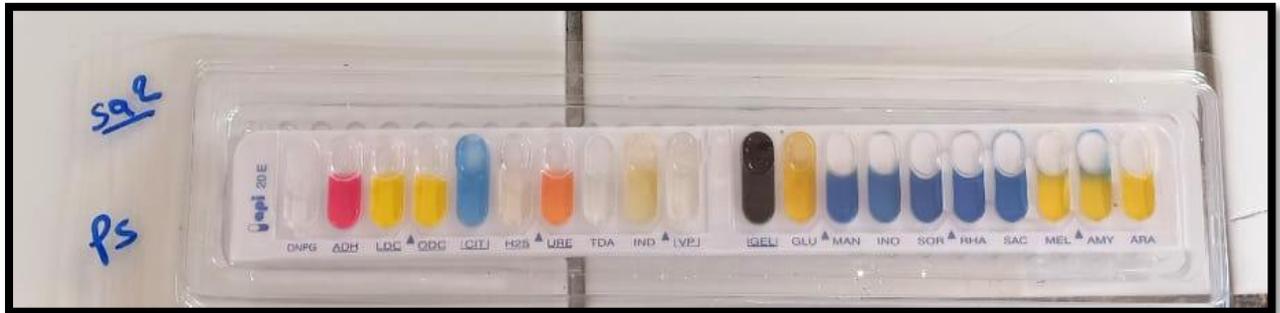


Figure 6 : Identification de *Pseudomonas aeruginosa* par la galerie API 20E.

- *Staphylococcus aureus*

L'identification bactérienne par le système API Staph a permis de caractériser et de confirmer la souche de *S. aureus* (Figure 7).



Figure 7 : Identification de *Staphylococcus aureus* par la galerie API Staph.

- *Klebsiella pneumoniae*

L'identification bactérienne par le système API 20E a permis de caractériser et aussi de confirmer la souche de *Klebsiella pneumoniae* (Figure 8).



Figure 8 : Identification de *Klebsiella pneumoniae* par la galerie API 20E.

2. Résultats de la formation de biofilm (mono et bi-espèces) des souches de *Staphylococcus aureus* – *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sélectionnées sur différents supports

P. aeruginosa est un organisme omniprésent capable de former des biofilms sur de nombreuses surfaces biotiques et abiotiques 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) ; (Brandon et Kaplan, 2013)].

K. pneumoniae est une bactérie à Gram négatif 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 humain (Brandon et Kaplan, 2013).

Outre le développement de biofilms sur les cathéters vasculaires et urinaires, sondes orotrachéales, stimulateurs cardiaques et valves cardiaques prothétiques, les infections liées au biofilms touchent également les implants orthopédiques (prothèses articulaires ou matériels d'ostéosynthèse). Le genre bactérien le plus représenté est celui des *Staphylococcus spp.* Cette espèce bactérienne possède des facteurs de virulence d'où sa capacité à former un biofilm et qui explique en partie son émergence comme pathogène nosocomial majeur (Lebeaux et Ghigo, 2012).

K. pneumoniae, *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont des organismes formant des biofilms qui peuvent coexister lors d'infections des voies urinaires, des voies respiratoires et surtout peuvent persister sur des dispositifs médicaux et engendrer des infections graves, l'association entre plusieurs bactéries engendre des biofilms considérables par rapport à ceux formés d'une seule bactérie (Espinasse et al., 2010).

La plupart des études sur les biofilms sont réalisées en monoculture (biofilms formés d'une seule espèce de micro-organismes). Cependant, dans de nombreux environnements naturels, les bactéries et autres micro-organismes se développent dans des communautés mixtes, souvent associées à des surfaces et sont rarement trouvés sous forme de culture pure, les biofilms hétérogènes composés de plusieurs espèces de micro-organismes sont prédominantes [(Rochemonteix, 2009) ; (Franklin *et al.*, 2015)].

Il y a plusieurs méthodes pour analyser les biofilms, parmi ces techniques il y a celle du cristal violet (CV) (Alnnasouri, 2010).

Le test cristal violet (CV) a été décrit pour la première fois par Christensen *et al.* (1982), puis a été constamment amélioré pour convenir à toutes les quantifications de biofilms. Le CV est un colorant qui tache les molécules de surface chargées négativement et la matrice extracellulaire de polysaccharides. Ce test utilise la spectrophotométrie pour mesurer la capacité des souches bactériennes à adhérer à une surface et/ou à former un biofilm [(Brian-Jaisson, 2014) ; (Xu *et al.*, 2016) ; (Tasse, 2017)]. Le test cristal violet (CV) est souvent préféré en raison de sa simplicité, de sa fiabilité et de son débit rapide [(Klein, 2011) ; (Metzler, 2016)].

Dans cette étude, le cristal violet a été utilisé de manière à déterminer la capacité des souches seules et mises ensembles à adhérer sur différents supports soit : le verre, le polypropylène et le polyéthylène.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la capacité des souches choisies à former des biofilms sur le support en verre de nature hydrophile et sur des supports en polypropylène et en polyéthylène de nature hydrophobe.

2.1. Résultats de la capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sur trois supports différents

Suite à nos résultats, la **Figure 9** montre que le taux de croissance de ces deux espèces bactériennes (PA et SA) est plus important sur des supports hydrophobes (polypropylène et le polyéthylène) où les DO enregistrées dépassent les 1,6 avec un léger avantage sur le support en polyéthylène. Les bactéries en mode planctonique croient moins sur le support en verre.

Les combinaisons PA-SA sont pratiquement toutes favorables au développement sur les supports hydrophobes, avec un bon développement en présence du *Pseudomonas aeruginosa*.

L'association de 50% PA / SA, a donné la plus petite valeur de la DO sur un support verre (DO 580 nm = 0,78).

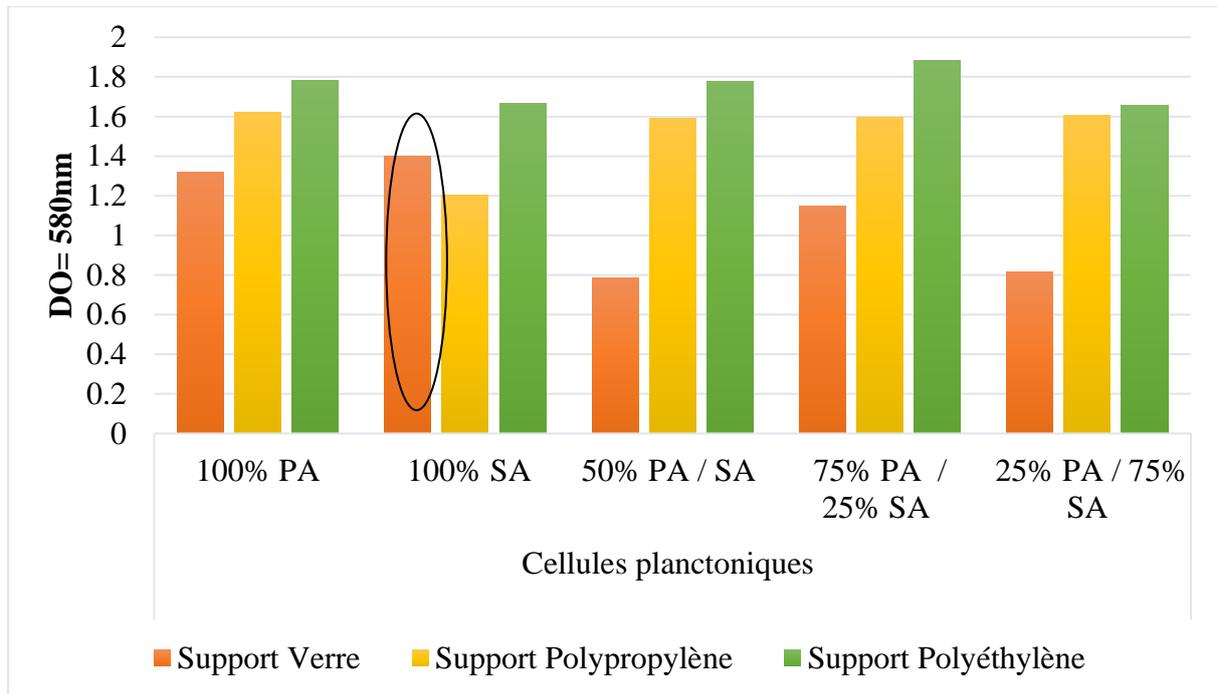


Figure 9 : Croissance des souches en mono et bi-espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* en bouillon LB sur différents supports.

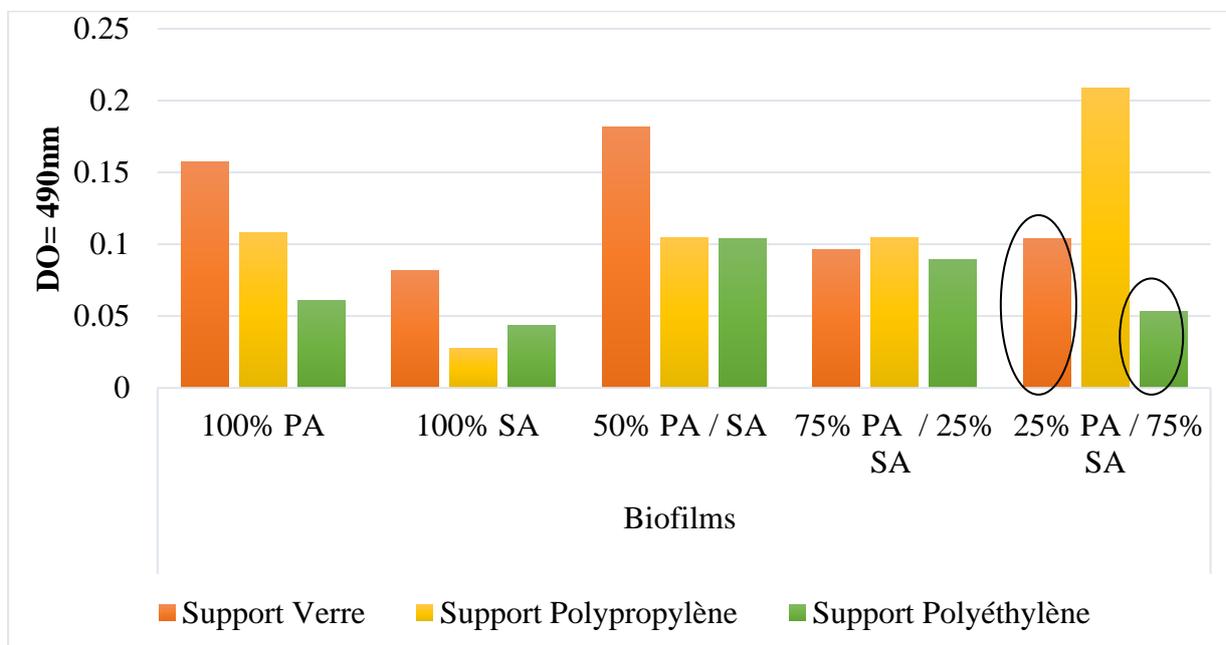


Figure 10 : Capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sur différents supports.

Rochemonteix (2009) et **Franklin et al. (2015)** ont démontré que les organismes qui prédominent sous forme planctonique ne sont pas nécessairement les mêmes prédominants au sein des biofilms. Leurs études en laboratoire ont permis d'évaluer quelles sont les espèces bactériennes qui deviennent prédominantes lors du changement des conditions environnementales.

Un des aspects majeurs des biofilms est l'induction de changements dans les phénotypes correspondant au changement de mode de comportement (de «*planctonique*» et individuel, à fixe et communautaire). Des séries entières de gènes voient changer la durée et le rythme de leurs mécanismes d'activation, correspondant donc aussi à des changements de fonctions. L'environnement particulier du biofilm permet aux cellules de coopérer et d'agir les unes avec les autres de manière différente qu'en environnement libre. Les bactéries vivant dans un biofilm ont des propriétés notablement différentes, voire très différentes de celles des bactéries « flottantes » de la même espèce (**Ghigo, 2001**).

Effectivement, la **Figure 10** où la croissance en mode biofilm montre un comportement totalement différent des espèces PA et SA à celui d'une croissance planctonique, où on constate que le support verre est le plus adapté à une bonne adhésion et cela indépendamment de la bactérie.

L'étude de **Mirani et al. (2018)** le montre bien et indique que *P. aeruginosa* et *S. aureus* présentent des propriétés de surface hydrophobes et ont une croissance relativement lente d'où leur bonne adhésion sur support hydrophile (verre). Tandis que les isolats d'*E. coli* présentaient des propriétés de surface hydrophiles et étaient en croissance relativement rapide. En raison des propriétés de surface hydrophobes et du taux de croissance lent, *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont montré une forte formation et persistance de biofilm. Parmi les trois microorganismes, *P. aeruginosa* est comparativement plus hydrophobe, à croissance lente et adopte le mode de vie du biofilm assez tard, dans cette catégorie, *S. aureus* vient ensuite.

Bruinsma et al. (2001) ont également démontré qu'une souche hydrophobe (*P. aeruginosa*) adhère mieux qu'une souche hydrophile (*S. aureus*).

La combinaison 50% PA-SA donne la meilleure adhésion, elle a permis de former un bon biofilm sur les trois supports, ce qui suggère la présence d'une interaction coopérative entre les deux bactéries.

Nous remarquons également que la présence de l'espèce PA à plus de 50% dans toutes les combinaisons semble favoriser l'adhésion surtout sur les supports hydrophobes

(polypropylène et polyéthylène). Contrairement la présence du SA à 75% semble freiner un peu l'adhésion essentiellement sur le support polyéthylène avec une DO presque nulle.

Chew et al. (2018) ont démontré dans leur étude que *P. aeruginosa* a limité la croissance de *S. aureus* et la formation de biofilm, alors qu'en présence de *S. aureus*, *P. aeruginosa* a montré une couverture de surface et un nombre de microcolonies accru. De plus, les microcolonies de *P. aeruginosa* étaient plus grandes et le biovolume global était plus élevé lorsque *S. aureus* était présent. Des observations similaires ont déjà été signalées pour des combinaisons de deux espèces, où il a été suggéré que *P. aeruginosa* lysait *S. aureus* pour être utilisé comme source de nutriments.

Qin et al. (2009) ont suggéré que les produits extracellulaires de *P. aeruginosa* sont d'importants facteurs de compétition microbienne qui surmontent et dispersent les biofilms staphylococciques. Cependant, l'extrait de culture sans cellules de *S. aureus* ou d'*E. coli* n'a eu aucun effet sur *P. aeruginosa* ou sur les biofilms de l'autre ni sur la croissance planctonique.

Les appendices protéiques tels que les pili, les fimbriae et les flagelles sont aussi considérés comme des éléments de structure puisqu'ils interagissent avec les autres composants de la matrice du biofilm. Par exemple, les pili de type IV de *Pseudomonas aeruginosa* lient à l'ADN extracellulaire du biofilm. Chez *S. typhimurium* et *E. coli*, les fimbriae se lient aux molécules de cellulose, permettant la formation d'une matrice rigide et hydrophobe. Les exopolysaccharides Pel et Psl, produits par *Pseudomonas aeruginosa*, possèdent une activité inhibitrice contre le biofilm mature de *Staphylococcus epidermidis*. Psl est un pentasaccharide composé de D-mannose, D-glucose et de L-rhamnose. Pel est un polysaccharide riche en molécules de glucose dont la structure exacte est encore méconnue (**Doghri, 2015**).

Des études sur les interactions entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont démontré que *P. aeruginosa* tue *S. aureus in vitro*, et cette interaction est censée contribuer à la dominance de *P. aeruginosa* sur *S. aureus* à mesure que les patients atteints de mucoviscidose vieillissent (**Nguyen et Oglesby-Sherrouse, 2016**).

Des progrès considérables ont été accomplis dans l'élucidation du mécanisme de mise à mort de *S. aureus* médiée par *P. aeruginosa*. Il a été démontré que HQNO et les deux sidérophores de *P. aeruginosa*, pyoverdine et pyochéline poussent les *S. aureus* vers un mode de vie fermentaire, tandis que les rhamnolipides perturbent l'intégrité de la membrane cellulaire. Les phénazines inhibent le métabolisme de *S. aureus* et jouent un rôle dans l'acquisition du fer et le développement du biofilm (**Price et al., 2020**).

2.2. Résultats sur la capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de *Staphylococcus aureus* et de *Klebsiella pneumoniae* et sur différents supports

Le comportement bi-espèce des souches SA-KP Selon les **Figures 11** et **12**, est très différent qu'il s'agit de support ou d'état de la bactérie. Nous constatons qu'en mode planctonique, les souches de SA quand elles sont seules se développent bien sur un support en polyéthylène avec une DO dépassant 1.6. Quant aux souches de KP seules, celles-ci préfèrent du polypropylène. Tout de même nous constatons que la DO de leur croissance augmente quand les souches sont mises ensemble dans le milieu LB avec une prédominance KP à 75 % (**Figure 11**).

Effectivement les études de **Bellifa (2014)** menées dans le même laboratoire « LAMAABE » montrent que sur un total de 300 souches de *Klebsiella sp.* 24 étaient hydrophiles et donc s'adhèrent beaucoup plus à des supports hydrophobes.

Les travaux de **M'Hamedi (2015)** réalisés dans le laboratoire « LAMAABE » sur l'hydrophobicité, le confirme et montre que la majorité des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées (17/30) supposées être hydrophobes présentent un caractère hydrophile. Alors que, les bactéries hydrophobes préfèrent des surfaces hydrophobes et les bactéries hydrophiles, les surfaces hydrophiles.

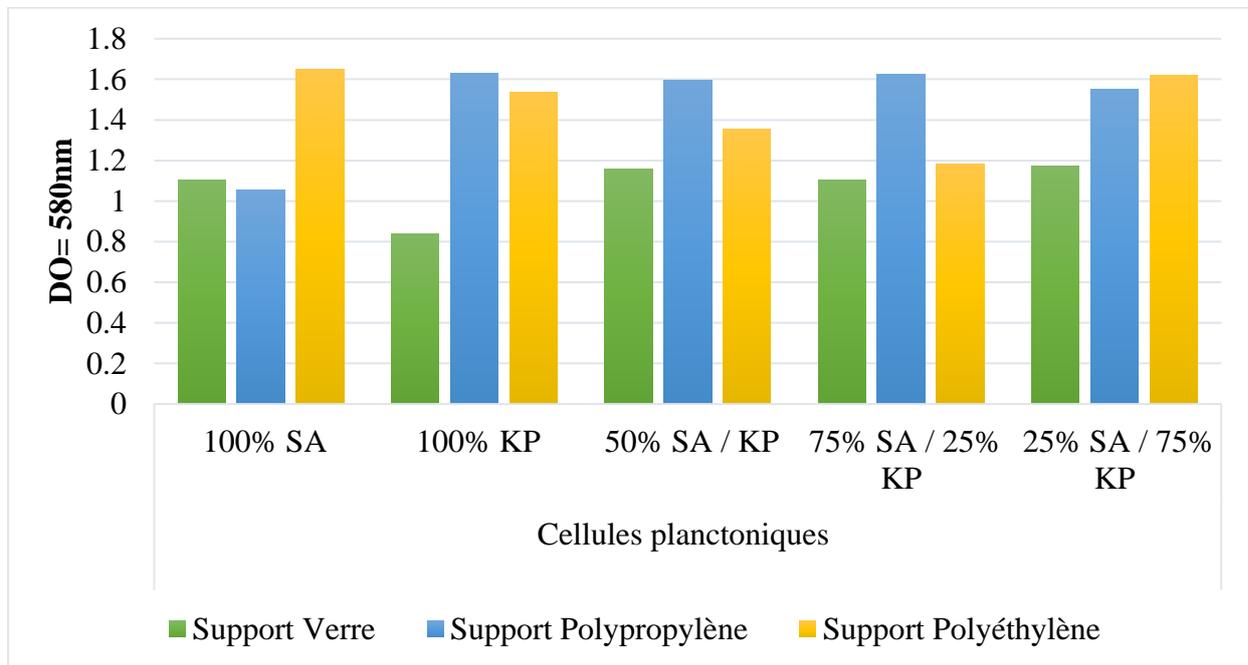


Figure 11 : Croissance des souches en mono et bi-espèces de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* en bouillon LB sur différents supports.

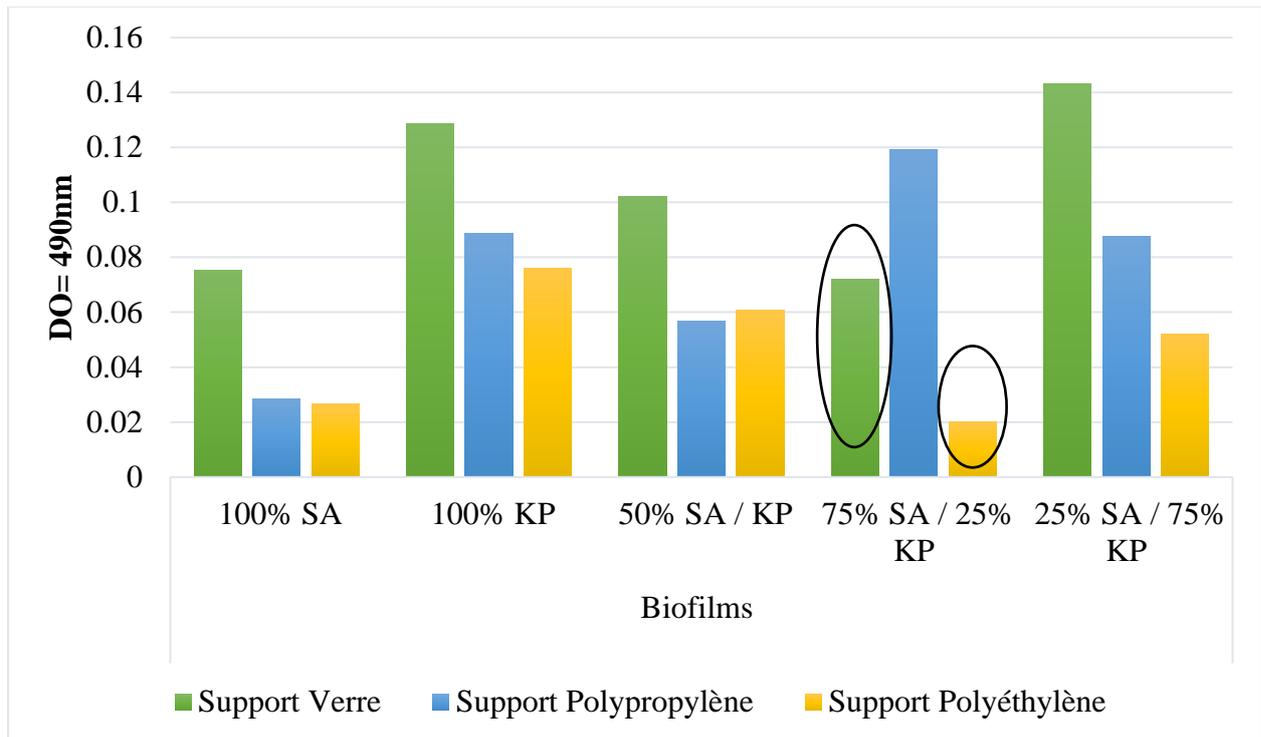


Figure 12 : Capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* sur différents supports.

Quant à la formation de biofilm chez ces mêmes espèces, les souches de KP sont plus aptes à former des biofilms sur ces trois supports. Néanmoins le support en verre de nature hydrophile semble favoriser une bonne adhésion. La bactérie SA seule ne forme pas un bon biofilm sur des supports hydrophobes à savoir le polyéthylène et le polypropylène (**Figure 12**).

L'association de 50% KP / SA semble booster le biofilm du SA où les DO sont supérieures à la DO de l'espèce seule.

Le biofilm bi-espèces à 75 % de SA sur le support en polypropylène semble favoriser le biofilm mixte entre ces deux espèces, on constate alors que la bactérie SA seule ne forme pas un bon biofilm mais sa dominance en présence de la bactérie KP permet de former un bon biofilm sur le polypropylène.

Contrairement aux deux autres en supports polyéthylène et en verre où leurs DO étaient inférieures aux DO des espèces seules, cette combinaison peut nous inciter à dire que fort possible la présence du SA à 75% peut inhiber ou empêcher l'adhésion du KP sur verre et sur polyéthylène, car à 75 % de KP l'adhésion est à son maximum sur ces supports.

La dominance de KP améliore la formation de biofilm sur le support en verre et en polypropylène.

Dans l'étude de **Hotterbeekx (2017)**, *S. epidermidis* et *K. pneumoniae* ont montré une relation compliquée et dépendante de la souche. Les deux ont pu coexister dans le même environnement, mais l'adhésion de *S. epidermidis* a diminué lors de la culture de deux espèces avec des cellules vivantes de *K. pneumoniae*. Le pré-revêtement d'une surface avec le surnageant de biofilm de *K. pneumoniae* pourrait réduire l'adhérence de *S. epidermidis* jusqu'à 24h. Cet effet a été perdu lorsque *S. epidermidis* a été incubé avec le surnageant de biofilm de *K. pneumoniae* dissous dans un milieu frais. Dans cette condition, la biomasse de la plupart des souches a même augmenté, à l'exception de quelques souches. *S. epidermidis* a montré un effet limité sur la production de biofilm de *K. pneumoniae*, bien que certaines souches aient été inhibées.

Bellifa et al. (2013) ont démontré que la plupart des souches de *K. pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux ont une adhérence élevée au PVC adhère fortement aux lames. De plus, ils ont démontré que la présence de gènes codant pour le type trois chez les klebsielles étaient associés à des indices de forte cohésion.

L'étude de **Lenchenko et al. (2020)** ont démontré que *K. pneumoniae* avait une activité adhésive élevée, était un puissant producteur de biofilms et que la densité optique de l'échantillon dépassait la densité optique du témoin de plus de quatre fois.

Makovcova et al. (2017) cite que les bactéries peuvent modifier leurs caractéristiques en raison des interactions interspécifiques et peuvent présenter des propriétés différentes selon leur développement dans des biofilms mono ou double espèce.

Les biofilms se trouvent dans différents environnements et ne sont généralement pas formés par une seule espèce, mais plutôt par des espèces doubles ou multiples. Les interactions de cellule à cellule influencent l'organisation temporelle et spatiale de l'architecture du biofilm et peuvent être classées comme coopératives ou compétitives [(**Elias et Banin, 2012**) ; (**Rendueles et Ghigo, 2012**)].

Varposhti et al. (2014) ont observé une coopération entre *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Stenotrophomonas maltophilia*, des bactéries pathogènes des voies respiratoires, lorsqu'elles sont cultivées dans des biofilms à deux espèces.

Peters et al. (2010) ont remarqué une coopération entre *S. aureus* et les espèces fongiques *Candida albicans* basée sur les interactions physiques et la régulation différentielle de facteurs de virulence spécifiques. Ils ont observé une pathogenèse accrue de *S. aureus* médiée par l'association de *S. aureus* avec des éléments hyphales de *Candida albicans* qui peuvent pénétrer à travers les couches épithéliales.

La compétition des microbes peut se manifester par le changement de leur environnement local soit directement, soit comme conséquence de leur métabolisme secondaire et de leurs sous-produits physiologiques. Par exemple, *Lactobacillus spp*, produisent de l'acide lactique qui abaisse le pH environnemental et limite ainsi la croissance d'autres espèces telles que *Neisseria gonorrhoeae*. Les bactéries utilisent également des composés de faible poids moléculaire. *Streptococcus pneumoniae* produit du peroxyde d'hydrogène comme sous-produit toxique du métabolisme aérobie. Dans le nasopharynx humain, c'est un inhibiteur de *Neisseria meningitidis* et *Moraxella catarrhalis* (Makovcova *et al.*, 2017).

2.3. Résultats sur la capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sur différents supports

La croissance de ces espèces (PA et KP) à Gram négatif est plus favorables sur des supports hydrophobes essentiellement sur du polyéthylène un peu moins sur le verre, on constate une bonne compétition entre elles. Concernant les bactéries cultivées seules, l'espèce KP semble être plus au moins favorable au verre par rapport à l'espèce PA. La bactérie PA a donné une valeur importante (DO 580 nm = 1,19) par rapport à la bactérie KP (DO 580 nm = 0,89).

Pour le cas des associations démontrées sur la **Figure 13**, la valeur la plus élevée est enregistrée pour l'association 50% PA / KP (DO 580 nm = 1,32) et la plus basse pour la culture à 25% PA / 75% KP (DO 580 nm = 0,796).

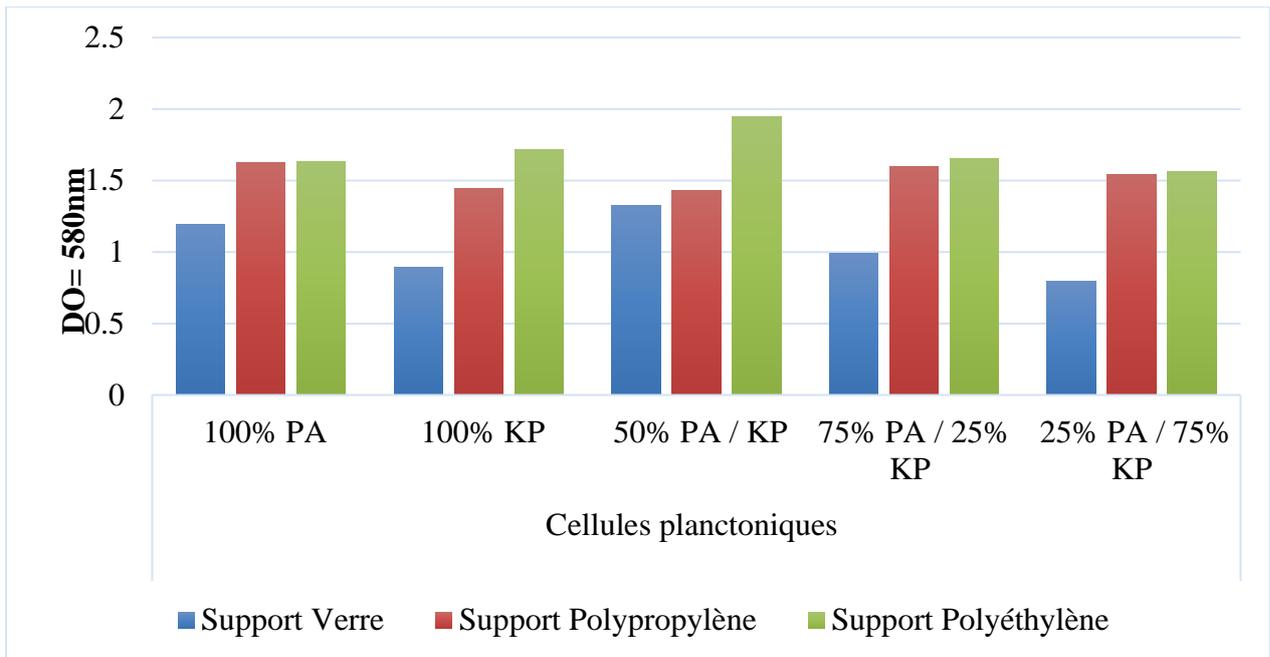


Figure 13 : Croissance des souches en mono et bi-espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* en bouillon LB sur différents supports.

Le taux de croissance de PA était toujours plus élevé que celui de KP dans des conditions de croissance planctonique. Pour les associations sur le polypropylène, la valeur la plus basse est enregistrée pour le cas de la culture à 50% PA / KP avec une (DO 580 nm= 1,43) et l'absorbance la plus élevée est noté pour 75% PA / 25% KP avec une (DO 580 nm = 1,6).

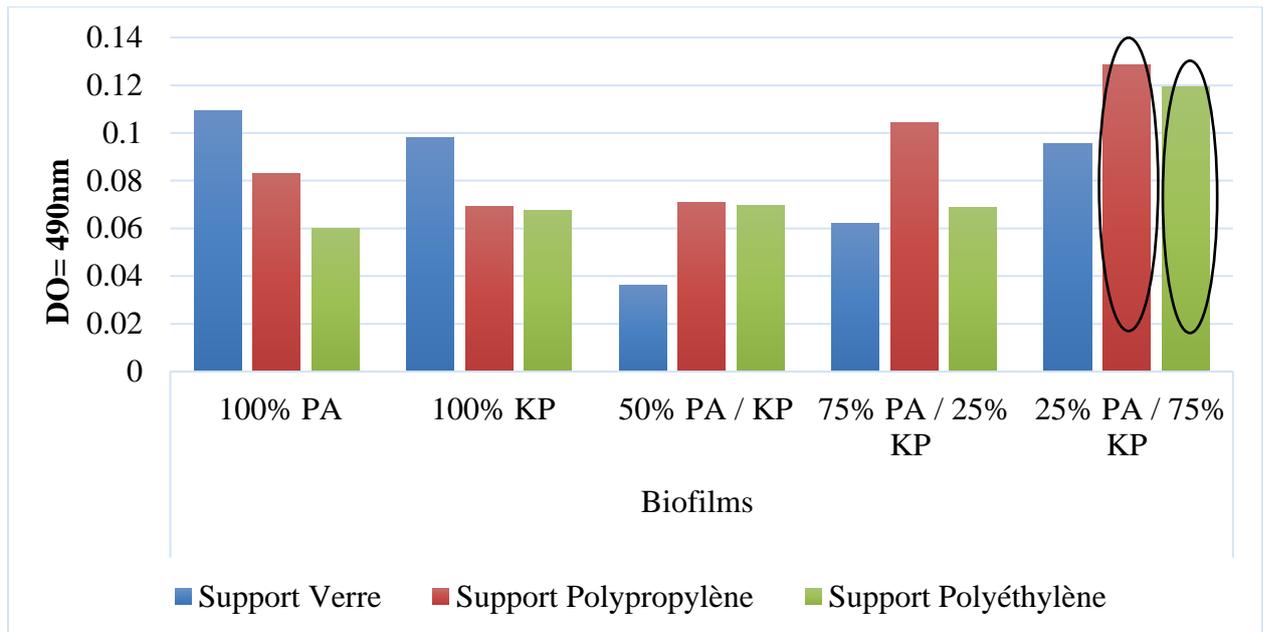


Figure 14 : Capacité de formation de biofilm mono et bi-espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* sur différents supports.

Quant à la **Figure 14**, les biofilms mono-espèce adhèrent mieux sur le verre et donc semble donner une bonne adhésion pour les PA et les KP suivi du polypropylène et du polyéthylène.

La plus grande valeur d'absorbance, pour le biofilm mono-espèce sur le support en verre, est notée pour la bactérie PA (DO 490 nm = 0,109) en comparaison avec la bactérie KP (DO 490 nm = 0,098).

Pseudomonas aeruginosa, l'un des modèles les mieux étudiés pour la formation de biofilms, produit au moins trois exopolysaccharides distincts (l'alginate, Pel et Psl) qui contribuent au développement du biofilm et au maintien de son architecture (**Ryder et al., 2007**). L'alginate est le produit le plus étudié dans la formation de biofilms de *P. aeruginosa* (**Tielen et al., 2005**). Ce polysaccharide joue un rôle important dans la structure tridimensionnelle du biofilm de *P. aeruginosa* (**Grobe et al., 1995**). En effet, le biofilm de l'espèce qui produit naturellement ce polysaccharide (*P. aeruginosa* SG81) présente une structure très hétérogène en champignons, tandis que l'espèce qui a perdu cette propriété (*P. aeruginosa* SG81R1) forme un biofilm homogène et lisse.

En ce qui concerne les biofilms mixtes, la plus faible valeur est celle de l'association 50% PA / KP (DO 490 nm = 0,036) ou on assiste presque à une compétition négative de PA sur verre. Alors que la valeur la plus élevée est enregistrée pour l'association 25% PA / 75% KP (DO 490 nm = 0,095). Par conséquent, le biofilm mixte le plus notable est constitué par

25% PA / 75% KP et que la dominance de KP améliore énormément la formation de biofilm à double espèce sur le verre.

En bi-espèce le comportement d'adhésion change et favorise les supports hydrophobes et beaucoup plus le polypropylène avec une combinaison de 75% de KP. On assiste à une compétition très positive et très favorable à une bonne adhésion.

Des interactions neutres ont été démontrées en laboratoire pour un biofilm mixte composé de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* cultivés dans un réacteur. Bien que les deux espèces utilisent la même source de nutriments, le taux de formation de produit spécifique et les rapports glucose-oxygène pour chaque organisme sont restés inchangés par rapport à leur croissance individuelle. Néanmoins, une concurrence a été observée lorsque les taux de fourniture d'éléments nutritifs et d'élimination des déchets ont diminué dans le même système, ce qui suggère que la concurrence entre les deux espèces peut se produire lorsque les ressources deviennent limitées. Ces observations soulignent également que les relations ne sont pas fixes, mais peuvent plutôt changer en fonction des conditions existantes (**Tan et al., 2017**).

P. aeruginosa est un organisme antagoniste qui utilise plusieurs effecteurs pour obtenir un avantage concurrentiel sur les autres organismes, dans les cultures sessiles et planctoniques. Ces effecteurs comprennent la LasA, la LasB, la N-homosérine lactone, la pyocyanine, l'acide cis-2-décénoïque et les rhamnolipides, qui peuvent tuer ou entraver la croissance de bactéries concurrentes ou perturber et disperser les bactéries des communautés de biofilm mixte. Ces effets ont été démontrés avec divers types de micro-organismes, dont *Candida albicans*, qui est sensible à la phénazine, et *Staphylococcus aureus*, qui est sensible à LasB. Cependant, il a été démontré que *K. pneumoniae* est capable de former un biofilm stable avec *P. aeruginosa*, suggérant des mécanismes potentiels utilisés par *K. pneumoniae* pour combattre ces effecteurs, qui peuvent également fournir des cibles potentielles qui pourraient conduire à la perturbation de biofilms composés de cette bactérie. Les résultats de cette étude suggèrent que la protéine de pointe fimbriale MrkD 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 *P. aeruginosa* dans un biofilm à espèces mixtes et fournit une défense contre les protéases microbiennes et dérivées de l'hôte (**Childers et al., 2013**).

Conclusion

Les biofilms sont des réservoirs de différentes espèces bactériennes, en conditions naturelles, les microorganismes se développent préférentiellement sur une surface plutôt qu'en suspension, aucun support ni plastique ni verre ne résiste à la colonisation bactérienne et à la formation de ces biofilms.

Au terme de notre étude, nous confirmons les récits de plusieurs auteurs à savoir que la colonisation et l'adhésion sur des surfaces abiotiques est influencée par plusieurs facteurs dont la variabilité de l'hydrophobicité des germes selon leur état physiologique, par les substances polymériques extracellulaires produites par les bactéries, par les propriétés de surface, et le milieu dont elles se trouvent.

Néanmoins, Cette étude a permis de souligner quelques paramètres qui influencent la bioadhésion. Celle-ci a été étudiée sur trois supports: le verre, le polypropylène et le polyéthylène à travers l'utilisation de trois espèces bactérienne isolées de dispositifs médicaux *Staphylococcus aureus* (relativement hydrophobe) *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (relativement hydrophiles). Nous avons constaté que le comportement d'adhésion de ces espèces sur les trois supports est différent selon que celles-ci soient seules ou en bi-espèces.

Seules (en mono biofilm), l'adhésion des trois espèces aux substrats hydrophiles (le verre) était importante comparée au support hydrophobe (le polypropylène et polyéthylène). L'adhésion d'une bactérie hydrophobe est plus importante qu'une bactérie hydrophile ce qui est en accord avec les résultats des travaux antérieurs tels **Bruinsma et al. (2001)** et **Mirani et al. (2018)**.

L'adhésion des isolats PA-SA et KP-SA en co-culture nous a permis de mettre en évidence que les isolats PA et KP (Bactéries à Gram -) aident l'isolat SA (à 25%) à adhérer sur le polypropylène et polyéthylène (matériaux sur lequel il n'adhérait pas très bien en monoculture) et qu'il permet la survie des deux isolats avec une interaction compétitive. D'un autre coté on assiste soit à une répulsion des bactéries ou à une interaction inhibitrice de l'adhésion des isolats KP-SA en co-culture sur le support polyéthylène quand la concentration de SA est de 75% où la DO était inférieure à celle observée en monoculture.

L'adhésion des isolats PA-KP en co-culture nous a permis de constater que la présence de KP en grande quantité (75%) favorise l'adhésion sur supports hydrophobes. Cela est du probablement à l'avantage de protéines en surface qu'ont certaines bactéries à adhérer plus rapidement que les bactéries possédant majoritairement des polysaccharides. De même la composition chimique des supports, le pH, la composition du milieu et la surface des différents isolats influent sûrement sur les cinétiques d'adhésion. Les bactéries sont capables

de modifier leurs propriétés en fonction de leur environnement en adaptant leur métabolisme et leur composition membranaire, et par conséquent leurs propriétés physico-chimiques de surface. Plusieurs approches doivent être combinées dans la recherche du biofilm pour une meilleure compréhension de ces communautés complexes. Les comportements biologiques des différentes cellules bactériennes dans les biofilms mixtes nous donnent d'importantes implications cliniques non seulement pour comprendre les interactions entre les bactéries en mode biofilm mixte mais également de pouvoir prévenir et lutter contre les infections chroniques liées aux dispositifs médicaux.

Quelle que soit la voie suivie pour les études prochaines, au vu des résultats obtenus au cours de cette étude, il semble souhaitable de former des biofilm bi-espèces et d'étudier l'influence d'autres paramètres tels que les conditions physico-chimiques, les propriétés acido-basique des bactéries, leur caractère d'hydrophobicité et pourquoi pas le rôle du film primaire.

Références bibliographiques

1. **Achinas S., Charalampogiannis N., Euverink G.J.W. (2019).** A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Applied Sciences appliqués*, Vol. 9(14), pp. 4-5.
2. **Adams J., Bartram J., Chartier Y. (2010).** Normes essentielles en matière de santé environnementale dans les structures de soins. *World Health Organization*.
3. **Alnnasouri M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Th. doct: Génie des Procédés et des Produits : Université de Lorraine, 57p.
4. **Alonso V.P.P., Harada A.M.M., Kabuki D.Y. (2020).** Interactions compétitives et / ou coopératives de *Listeria monocytogenes* avec *Bacillus cereus* dans la formation de biofilms à double espèce. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 11, 177p.
5. **Amini N., Rezaei K., Yazdannik, A. (2016).** Effect of nebulized eucalyptus on contamination of microbial plaque of endotracheal tube in ventilated patients. *Iranian Journal of Nursing and Midwifery Research*, Vol. 21(2), 165p.
6. **Anju V. T., Paramanantham P., Siddhardha B., Lal S. S., Sharan A., Alyousef A. A., Arshad M., Syed A. (2019).** Malachite green-conjugated multi-walled carbon nanotubes potentiate antimicrobial photodynamic inactivation of planktonic cells and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 14, pp. 3861- 3874.
7. **Arciola C.R., Campoccia D., Ehrlich G.D., Montanaro L. (2015).** Biofilm Based Implant Infections in Orthopaedics. In: Donelli G, ed. Biofilm-based Healthcare-associated Infections. Advances in Experimental Medicine and Biology. *Springer International Publishing*, pp. 29-46.
8. **Armbruster C. E., Mobley H. L., Pearson M. M. (2018).** Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus*, Vol. 8(1), pp.1-2.
9. **Barakat R., Goubet I., Manon S., Berges T., Rosenfeld, E. (2014).** Unsuspected Pyocyanin Effect in Yeast under Anaerobiosis. *Microbiologyopen*, Vol. 3(1), pp. 1-14.
10. **Barriuso J. (2015).** Quorum sensing mechanisms in fungi. *AIMS Microbiol*, Vol. 1(1), pp. 37-47.
11. **Baudin M. (2017).** Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. Th. doct: Biologie: Université Paris-Saclay – Paris, 7p.
12. **Bellifa S., Hassaine H., Balestrino D., Charbonnel N., Mrsquo I., Terki I.K., Forestier C. (2013).** Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 7(49), pp. 5558-5564.
13. **Bengoechea J. A., Sa Pessoa J. (2019).** *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, Vol. 43(2), pp. 123-144.
14. **Benmahdi L. (2017).** Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique : Bactériologie et biofilm. Th. doct: Pharmacie : Université d'Oran, pp. 32-70.
15. **Bezoui M. (2016).** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Th. doct: Pharmacie: Université Mohammed V-Rabat, 4p.

16. **Bhatt V.S. (2018).** Quorum Sensing Mechanisms in Gram Positive Bacteria. *In Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence.* Springer, Singapore, pp. 297-311.
17. **Bossa L., Kline K., McDougald D., Lee B.B., Rice S.A. (2017).** Urinary catheter-associated microbiota change in accordance with treatment and infection status. *PLoS one*, Vol. 12(6), 2p.
18. **Brandon D., Kaplan W.D. (2013).** Microstructural characterization of materials. *John Wiley & Sons.*
19. **Brian-Jaisson F. (2014).** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Th. doct: Microbiologie / Biochimie: Université de Toulon, 76p.
20. **Burmølle M., Ren D., Bjarnsholt T., Sørensen S.J. (2014).** Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?. *Trends in microbiology*, Vol. 22(2), pp. 88-89.
21. **Cady J. (2018).** Effets de la décontamination digestive sélective (DDS) sur l'incidence des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) chez les patients traumatisés crâniens graves. Th. doct: Médecine: Université de Nice Sophia-Antipolis, pp. 3-4.
22. **Cattò C., Cappitelli F. (2019).** Testing Anti-Biofilm Polymeric Surfaces: Where to Start?. *International journal of molecular sciences*, Vol. 20(15), 3794 p.
23. **Chew S.C., Yam J.K.H., Matysik A., Seng Z.J., Klebensberger J., Givskov M., Kjelleberg S. (2018).** Matrix polysaccharides and SiaD diguanylate cyclase alter community structure and competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* during dual-species biofilm development with *Staphylococcus aureus*. *MBio*, Vol. 9(6), pp. 1-16.
24. **Childers B.M., Van Laar T.A., You T., Clegg S., Leung K.P. (2013).** MrkD1P from *Klebsiella pneumoniae* strain IA565 allows for coexistence with *Pseudomonas aeruginosa* and protection from protease-mediated biofilm detachment. *Infection and immunity*, Vol. 81(11), pp. 4112-4120.
25. **Choudhary P., Singh S., Agarwal V. (2020).** Microbial Biofilms. In *Bacterial Biofilms. Biofilms. Intech Open*, 4p.
26. **Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A. L., Beachey E.H. (1982).** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity*, Vol. 37(1), pp. 318-326.
27. **Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, Vol. 121(1-2), pp. 1-17.
28. **Cortese Y. J., Wagner V. E., Tierney M., Devine D., Fogarty A. (2018).** Review of catheter-associated urinary tract infections and in vitro urinary tract models. *Journal of healthcare engineering*, 2p.
29. **Deschaine B.M., Heysel A.R., Lenhart B.A., Murphy H.A. (2018).** La formation de biofilms et la production de toxines offrent un avantage de fitness dans des colonies mixtes d'isolats environnementaux de levures. *Écologie et évolution*, Vol. 8(11), pp. 5541-5550.

30. **Didouh N. (2016).** Caractérisation de spores de *Bacillus cereus* isolées d'équipements laitiers, capacité de formation de biofilm et résistance aux procédés de nettoyage et de désinfection. Th. doct: Biologie moléculaire et biochimie : Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pp. 9-11.
31. **Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L.A. (2002).** Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 68(6), pp. 2950-2958.
32. **Doghri I. (2015).** Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin : mise en évidence de biomolécules antibiofilm. Th. doct: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie : Université de la Rochelle, 36p.
33. **Douarche C., Bailleux V., Even C., Allain J.M., Regeard C., Raspaud É. (2018).** La mécanique des biofilms à la surface de liquides. *Reflète de la physique*, Vol. 1(56), pp. 20-24.
34. **Elias S., Banin E. (2012).** Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, Vol. 36(5), pp. 992-997.
35. **Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*, Vol. 2010(426), pp. 51-63.
36. **Franklin M. J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. (2015).** New technologies for studying biofilms. *Microbial Biofilms*, pp. 1-32.
37. **Garnacho-Montero J., Timsit J.F. (2019).** Managing *Acinetobacter baumannii* infections. *Current opinion in infectious diseases*, Vol. 32(1), pp. 69-76.
38. **Gellatly S.L., Hancock R.E.W. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, Vol. 67(3), 164p.
39. **Ghigo J.M. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, Vol. 412(6845), pp. 442-445.
40. **Grobe S., Wingender J., Trüper H. G. (1995).** Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *Journal of applied bacteriology*, Vol. 79(1), pp. 94-102.
41. **Hajoubi W.** Les infections associées aux biofilms. (2019). Th. doct: médecine: Université Mohammed V-Rabat, p.
42. **Hiltunen A. K., Savijoki K., Nyman T. A., Miettinen I., Ihalainen P., Peltonen J., Fallarero A. (2019).** Structural and Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms*, Vol. 7(12), 584 p.
43. **Hotterbeekx A. (2017).** The microbiome and microbial interactions in in vitro and in vivo endotracheal tube biofilms Th. doct: sciences médicales: Université d'Anvers, 127p.
44. **Houvion E. (2014).** Le biofilm dentaire: composition, formation et propriétés. Th. doct: Odontologie: Université de Lorraine, 60p.
45. **Khatoon Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Alarcon E.I. (2018).** Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, Vol. 4(12), pp. 1-36.

46. **Klein G. (2011).** Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Th. doct: Microbiologie: Université européenne de Bretagne, 179 p.
47. **Kurmoo Y., Hook A.L., Harvey D., Dubern J.F., Williams P., Morgan S.P., Korposh S., Alexander M.R. (2020).** Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of bacterial infections. *Biomaterials Science*, Vol. 8(5), pp. 1464-1477.
48. **Lattab A. (2018).** Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Th. doct: Microbiologie : Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem, 23p.
49. **Lebeaux D., Ghigo J.M. (2012).** Infections associées aux biofilms-Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale?. *médecine/sciences*, Vol.28 (8-9), pp. 727-739.
50. **Lebeaux D., Lucet J.-C., Barbier F.S. (2016).** Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm : implications en réanimation. *Réanimation*, Vol. 25(3), pp. 308–317.
51. **Lenchenko E., Blumenkrants D., Sachivkina N., Shadrova N., Ibragimova A. (2020).** Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Veterinary World*, Vol. 13(1), 197p.
52. **Li Y.H., Tian X. (2012).** Détection du quorum et interactions sociales bactériennes dans les biofilms. *Capteurs*, Vol. 12(3), pp. 2520-2521.
53. **Li Y.H., Tian X.L. (2016).** Microbial Interactions in Biofilms: Impacts on Homeostasis and Pathogenesis. *Microbial Biofilms: Importance and Applications*, 43p.
54. **Liu W., Røder H.L., Madsen J.S., Bjarnsholt T., Sørensen S.J., Burmølle M. (2016).** Interspecific bacterial interactions are reflected in multispecies biofilm spatial organization. *Frontiers in microbiology*, Vol. 7, p.1366.
55. **Lories B., Roberfroid S., Dieltjens L., De Coster D., Foster K.R., Steenackers H.P. (2020).** Biofilm bacteria use stress responses to detect and respond to competitors. *Current Biology*, pp. 1231-1244.
56. **Makovcova J., Babak V., Kulich P., Masek J., Slany M., Cincarova L. (2017).** Dynamics of mono-and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microbial biotechnology*, Vol. 10(4), pp. 819-832.
57. **Marino P.J., Wise M.P., Smith A., Marchesi J.R., Riggio M.P., Lewis M.A.O., Williams D.W. (2017).** Community analysis of dental plaque and endotracheal tube biofilms from mechanically ventilated patients. *Journal of Critical Care*, Vol. 39, pp. 149-155.
58. **Maurice N.M., Bedi B., Sadikot R.T. (2018).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, Vol. 58(4), pp. 428-439.
59. **Medeiros A.C.D.A.P. (2016).** Étude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Th. doct: Mécanique des fluides, Énergétique, Procédés : Université Grenoble Alpes, 10p.

60. Metzler A. (2016). Developing a Crystal Violet Assay to Quantify Biofilm Production Capabilities of *Staphylococcus aureus*. Th. doct: animal sciences: Université d'État de l'Ohio, 4p.
61. Mion S., Rémy B., Plener L., Chabrière É., Daudé D. (2019). Quorum sensing et quorum quenching: Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence?. *médecine/sciences*, Vol. 35(1), pp. 31-38.
62. Mirani Z.A., Fatima A., Urooj S., Aziz M., Khan M.N., Abbas T. (2018). Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iranian journal of basic medical sciences*, Vol. 21(7), 760p.
63. Nguyen A.T., Oglesby-Sherrouse A.G. (2016). Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during co-cultivations and polymicrobial infections. *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 100(14), pp. 6141-6148.
64. Nobile C.J., Johnson A.D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual review of microbiology*, Vol. 69, pp. 71-92.
65. Paharik A.E., Horswill A.R. (2016). The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, pp. 529-566.
66. Pantaleon V. (2015). Le biofilm de *C. difficile* : rôle des protéines de surface. Th. doct: Microbiologie et thérapeutiques anti-infectieuses : Université Paris-Sud, 62p.
67. Peters B.M., Jabra-Rizk M.A., Scheper M., Leid J.G., William Costerton J.W., Shirtliff M.E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* – *Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*, Vol. 59(3), pp. 493– 503.
68. Presterl E., Diab-El Schahawi M., Lusignani L.S., Paula H., Reilly J.S. (2019). Medical Instruments and Devices. In *Basic Microbiology and Infection Control for Midwives*. Springer, Cham, pp. 29-33.
69. Price C.E., Brown D.G., Limoli D.H., Phelan V.V., O'Toole G.A. (2020). Exogenous alginate protects *Staphylococcus aureus* from killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 202(8).
70. Puiu R.A., Dolete G., Ene A.M., Nicoară B., Vlăsceanu G.M., Holban A.M., Bolocan A. (2017). Properties of biofilms developed on medical devices. In *Biofilms and Implantable Medical Devices*, Woodhead Publishing, pp. 25-46.
71. Ramasamy M., Lee J. (2016). Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices. *BioMed research international*, pp. 1-17.
72. Rao D., Webb J.S., Kjelleberg S. (2005). Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol*, Vol. 71(4), pp. 1729-1736.
73. Rendueles O., Ghigo J.M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, Vol. 36(5), pp. 972-989.
74. Ren-Pei W., Hui-Jun X., Ke Q., Dong W., Xing N., Zhao-Shen L. (2014). Correlation between the growth of bacterial biofilm in flexible endoscopes and

- endoscope reprocessing methods. *Journal américain de contrôle des infections*, Vol. 42(11), pp. 1203-1206.
- 75. Rochemonteix C. A. (2009).** Les biofilms et la peau, Th. doct : Vétérinaire : Université Paris-Est Créteil, 5p.
- 76. Roux A., Ghigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, pp. 261-268.
- 77. Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V. (2018).** Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, Vol. 9(1), pp. 522-554.
- 78. Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J. (2007).** Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology*, Vol. 10(6), pp. 644-648.
- 79. Sarjit A., Tan S.M., Dykes G.A. (2015).** Surface modification of materials to encourage beneficial biofilm formation. *AIMS Bioeng*, Vol. 2(4), pp. 404-422.
- 80. Saur T. (2014).** Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : de l'adhésion au biofilm mature. Th. doct: Génie des procédés : Université Montpellier II, 36p.
- 81. Scheffer M., Van Nes EH. (2006).** Similitude auto-organisée, émergence évolutive de groupes d'espèces similaires. *Actes de l'Académie nationale des sciences*, Vol. 103(16), pp. 6230-6235.
- 82. Schiebel J., Böhm A., Nitschke J., Burdukiewicz M., Weinreich J., Ali A., Roggenbuck D., Rodiger S., Schierack P. (2017).** Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol*, Vol. 83(24), pp. 1-43.
- 83. Seghir A. (2015).** Recherche de biofilms mixtes sur cathéters veineux périphériques au CHU de Tlemcen. Th. doct: Biologie Cellulaire et Biochimie : Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, 5p.
- 84. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Sari-Belkharroubi L. (2015).** Evaluation of mixed biofilm formation between *Candida albicans* and a variety of bacterial species isolated from peripheral catheters at Tlemcen CHU. First study in Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*, Vol. 25(2), pp. 123-129.
- 85. Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Sari-Belkharroubi L., Boucherit K. (2017).** Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (*Candida* – bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journal de Mycologie Médicale*, Vol. 27(1), pp. 20–27.
- 86. Skerniškytė J., Krasauskas R., Péchoux C., Kulakauskas S., Armalytė J., Sužiedėlienė E. (2019).** Surface-related features and virulence among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates belonging to international clones I and II. *Frontiers in microbiology*, Vol. 9, 3116 p.
- 87. Srivastava A., Chandra N., Kumar S. (2019).** The Role of Biofilms in Medical Devices and Implants. In *Biofilms in Human Diseases: Treatment and Control*. Springer, Cham, pp. 151-165.

88. **Tan C.H., Lee K.W.K., Burmølle M., Kjelleberg S., Rice S.A. (2017).** All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*, Vol. 19(1), pp. 42-53.
89. **Tasse J. (2017).** Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections osteo-articulaires aux staphylocoques. Th. doct: Microbiologie: Université Claude Bernard Lyon 1, 210 p.
90. **Tielen P., Strathmann M., Jaeger K.E., Flemming H.C., Wingender J. (2005).** Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*, Vol. 160(2), pp. 165-176.
91. **Tong H., Chen W., Shi W., Qi F., Dong X. (2008).** SO-LAAO, a novel L-amino acid oxidase that enables *Streptococcus oligofermentans* to outcompete *Streptococcus mutans* by generating H₂O₂ from peptone. *Journal of Bacteriology*, Vol. 190(13), pp. 4716-4721.
92. **Tremblay Y.D., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 78(2), pp. 110-116.
93. **Varposhti M., Entezari F., Feizabadi M. (2014).** Synergistic interactions in mixed-species biofilms of pathogenic bacteria from the respiratory tract. *Rev Soc Bras Med Trop*, Vol. 47(5), pp. 649– 652.
94. **Wi Y. M., Patel R. (2018).** Understanding Biofilms and Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. *Infectious Disease Clinics*, Vol. 32(4), pp. 915-929.
95. **Wu H., Moser C., Wang H.Z., Høiby N., Song Z.J. (2015).** Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*, Vol. 7(1), pp. 1-7.
96. **Xu Z., Liang Y., Lin S., Chen D., Li B., Li L., Deng Y. (2016).** Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current microbiology*, Vol. 73(4), pp. 474-482.
97. **Yadav M.K., Chae S.W., Go Y.Y., Im G.J., Song J.J. (2017).** Biofilms multi-espèces in vitro de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* résistants à la méthicilline et leur interaction avec l'hôte pendant la colonisation in vivo d'un modèle de rat otite moyenne. *Frontiers in cellulaire and infection microbiology*, Vol. 7, 125p.
98. **Yang L., Liu Y., Wu H., Høiby N., Molin S., Song Z.J. (2011).** Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of oral science*, Vol. 3(2), pp. 76-77.

Annexes

Annexe 1 : Préparation des milieux de culture et des solutions**Annexe 1.1 : Préparation du milieu sélectif Mac Conkey**

- | | |
|-----------------------------|---------|
| ➤ Mac Conkey (poudre) | 51,59 g |
| ➤ Eau distillé | 1000 mL |

Annexe 1.2 : Préparation du milieu sélectif Cétrimide

- | | |
|---------------------------|---------|
| ➤ Cétrimide (poudre)..... | 45.3 g |
| ➤ Eau distillé | 1000 mL |

Annexe 1.3 : Préparation du milieu sélectif Chapman

- | | |
|-------------------------|---------|
| ➤ Chapman (poudre)..... | 111 g |
| ➤ Eau distillé | 1000 mL |

Annexe 1.4 : Préparation du milieu LB

- | | |
|-------------------------------|---------|
| ➤ Luria Bertani (poudre)..... | 20 g |
| ➤ Eau distillé | 1000 mL |

Annexe 1.5 : Préparation de la solution du Cristal Violet à 1%

- | | |
|---------------------------------|--------|
| ➤ Cristal Violet (poudre) | 1g |
| ➤ Eau distillé..... | 100 mL |

Annexe 1.6 : Préparation de la solution Éthanol-Acétone (75/25)

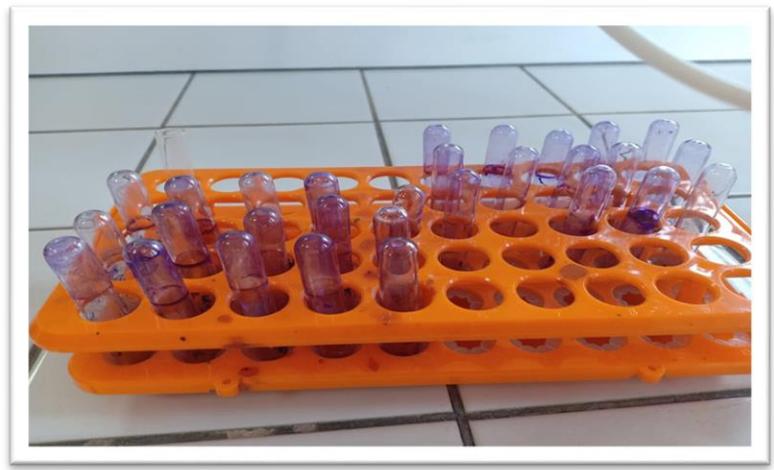
- | | |
|-----------------|-------|
| ➤ Éthanol | 75 mL |
| ➤ Acétone | 25 mL |

Annexe 2 : Formation de biofilm en tubes

Annexe 2.1 : Suspension bactérienne dans le bouillon LB



Annexe 2.2 : Résultats de formation de biofilm sur le verre après coloration au CV



Annexe 2.3 : Résultats de formation de biofilm sur le polypropylène après coloration au CV



Annexe 2.4 : Résultats de formation de biofilm sur le polyéthylène après coloration au CV



Résumés

ملخص

الأغشية الحيوية هي خزانات لأنواع بكتيريا مختلفة حيث تحت الظروف الطبيعية تنمو الكائنات الحية الدقيقة بشكل تفضيلي على سطح بدلا من تعليقه. في هذا المنظور، درسنا الالتصاق لثلاثة أنواع بكتيريا معزولة من الأجهزة الطبية : *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* - *Pseudomonas aeruginosa* على ثلاثة دعومات مختلفة باستخدام تلوين الكريستال البنفسجي. نتائجا تثبت أن سلوك الالتصاق يختلف من نوع بكتيري إلى آخر على الدعومات الثلاثة وذلك حسب كونها وحيدة أو مختلطة. أن التصاق الغشاء الحيوي الأحادي اكبر على الدعم الزجاجي على عكس الأغشية الحيوية ثنائية على الالتصاق بالمسعود (SA عزلة KP و PA الأنواع حيث يدعم البولي بروبلين والبولي إيثيلين الذي يشكل غشاء حيوي جيد. تساعد عزلات على دعم البولي بولي إيثيلين عندما يكون KP-SA كاره للماء) حيث يدعم تفضيل التفاعل التنافسي. هناك أيضا تفاعل المثبط على التصاق عزله تركيز 75% SA. هيمنة PK تعزز التصاق بمسعود. يجب إجراء العديد من الأبحاث من أجل فهم أفضل لهذه المجتمعات و أيضا من أجل منع و مكافحة العدوى المتعلقة بالأجهزة الطبية.

الكلمات المفتاحية : بكتريا - *Klebsiella pneumoniae* - *Staphylococcus aureus* - *Pseudomonas aeruginosa* - أجهزة طبية - غشاء حيوي مختلط - الزجاج - بولي بروبلين - بولي إيثيلين.

Résumé

Les biofilms sont des réservoirs de différentes espèces bactériennes, en conditions naturelles, les microorganismes se développent préférentiellement sur une surface plutôt qu'en suspension.

Dans cette perspective, on a étudié l'adhérence de trois espèces bactériennes isolées des dispositifs médicaux : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* sur trois supports différents en utilisant la coloration au Cristal Violet. Suite à nos résultats, le comportement d'adhésion de ces espèces sur les trois supports est différent selon que celles-ci soient seules ou en bi espèces. L'adhésion des mono espèces était plus importante sur le support en verre (hydrophile) à l'inverse des biofilms bi-espèces où les supports en polypropylène et polyéthylène favorisaient un bon biofilm. Les isolats PA et KP aident l'isolat SA à adhérer sur les supports hydrophobes favorisant une interaction compétitive. On assiste également à une interaction inhibitrice de l'adhésion des isolats KP-SA en co-culture sur le support en polyéthylène quand la concentration de SA est de 75%. La dominance de KP favorise l'adhésion sur les supports hydrophobes. Plusieurs recherches doivent être effectuées en vue de mieux comprendre ces communautés mais également de prévenir et lutter contre les infections liées aux dispositifs médicaux.

Mots clés : Bactéries – *Pseudomonas aeruginosa* – *Staphylococcus aureus* – *Klebsiella pneumoniae* – dispositifs médicaux – biofilm mixte – adhésion – verre – polypropylène – polyéthylène.

Abstract

Biofilms are reservoirs of different bacterial species, under natural conditions, microorganisms preferentially grow on a surface rather than in suspension. In this perspective, we studied the adhesion of three bacterial species isolated from medical devices: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* on three different supports using Crystal Violet staining. Following our results, the adhesion behavior of these species on the three supports is different depending on whether they are alone or in two species. The adhesion of mono-species was greater on the glass support (hydrophilic) unlike bi-species biofilms where the polypropylene and polyethylene supports favored a good biofilm. The PA and KP isolates help the SA isolate to adhere to hydrophobic supports favoring a competitive interaction. There is also an inhibitory interaction on the adhesion of KP-SA isolates in coculture on the polyethylene support when the SA concentration is 75%. The dominance of KP promotes adhesion to hydrophobic supports. Several researches must be carried out in order to better understand these communities but also to prevent and fight infections related to medical devices.

Key words: Bacteria – *Pseudomonas aeruginosa* – *Staphylococcus aureus* – *Klebsiella pneumoniae* – medical devices – mixed biofilm – adhesion – glass – polypropylene – polyethylene.