

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'enseignement supérieur
Et de La Recherche Scientifique
Université De Souk-Ahras
Institut Des Sciences Et de technologie



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
سوقة أهراس
معهد العلوم والتكنولوجيا

Mémoire de magister

Spécialité: Chimie physique et analytique

Option : Chimie de l'environnement et traitement des eaux

THEME

Bioadhésion sur supports inertes : Influence de certains paramètres physico-chimiques sur la formation du biofilm d'*Enterococcus faecalis*.

Présenté par : M^{elle} MEDDOUR Faïza

Soutenu devant le Jury:

A.GHEID
R.DJERIBI
M.HOUHAMEDI
T.MERAD
N. GRARA

Professeur. U- Souk – Ahras
MCA. U- Badji-MOKHTAR-ANNABA
Professeur. U- 8 Mai 45- GUELMA
MCA.U- Badji-MOKHTAR-ANNABA
MCB. U- Souk – Ahras

Président
Directeur de mémoire
Examinateur
Examinateur
Examinatrice

Année 2012

Je dédie ce mémoire :

A la mémoire de mes parents;

A la mémoire de mon frère Fahim;

A mes frères ;

A toute ma Famille.

Remerciements

Merci à dieu qui m'a éclairci le bon chemin, qui m'a procuré patience et force pour surmonter une épreuve difficile qui a duré cinq ans ,et enfin réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire des Biofilms et Biocontaminations des Matériaux (LBBM) Université Badji Mokhtar-ANNABA.

Je remercie Mr DJERIBI Maître de conférences de l'université Badji-MOKHTAR -ANNABA d'avoir accepté de m'encadrer, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. En témoignage de ma profonde reconnaissance

Que Mr A.GHEID Professeur de l'université de Souk-Ahras trouve la signature de ma gratitude pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie Madame Néjoud GRARA Maître de conférences de l'université de Souk-Ahras D'avoir accepté de juger ce travail, qu'elle en soit vivement remerciée.

Je remercie également Mr Moussa HOUHAMEDI Professeur de L'université 8 Mai 45 -GUELMA pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté d'examiner ce travail. Avec toute ma gratitude.

Je voudrais remercier Monsieur Tarek MERAD Maître de conférences de l'université Badji- MOKHTAR -ANNABA Qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail. Mes sincères reconnaissances.

Que Mr .SID et Mr DJEBAR trouvent ici la signature de mon Respect, reconnaissance, et gratitude pour leurs soutiens à mon cas.

Mes remerciements pour toute l'équipe du laboratoire (LBBM) université Badji-MOKHTAR-ANNABA, surtout Warda, Mejda, et Amina, pour leurs aides et leurs gentillesse.

Enfin mes vifs remerciements à mon amie Mouna.

Liste des Figures de la partie I

N°figure	Titre	page
I.1	Aspect d'un biofilm mature Center For Biofilm Engineering Montana State University-Bozeman	6
II.1	Phénomène de biofouling sur la coque d'un navire. Le biofilm bactérien est recouvert par une couche de micro-algues, de champignons et d'invertébrés. Ici la coque est totalement recouverte par l'algue verte <i>Enteromorpha</i> (photo, Dr M.E. Callow)	11
II.2	Représentation schématique de la section longitudinale d'une canalisation d'un réseau de distribution d'eau potable montrant l'accumulation du biofilm sur la surface interne de cette canalisation (d'après Block et all.)	12
II.3	Représentation d'un biofilm développé dans une canalisation d'eau potable (PR-Company GmbH, 2004)	13
II.4	Les bactéries planctoniques peuvent être éliminées par les mécanismes de défense naturels (anticorps, phagocytes...) et elles sont sensibles aux antibiotiques.	16
II.5	Les bactéries peuvent adhérer entre elles pour former un biofilm notamment sur une surface inerte; cette communauté, sessile, est résistante aux anticorps, aux phagocytes et aux antibiotiques	17
II.6	Les phagocytes sont attirés par les biofilms. La phagocytose est inopérante mais les enzymes phagocytaires sont libérées localement	18
II.7	Les enzymes phagocytaires vont endommager les tissus autour du biofilm et des bactéries planctoniques vont essaimer du biofilm. Cette libération peut être la cause d'une dissémination de l'infection et d'une infection aiguë dans un tissu voisin	19

II.8	Différence entre les CMI & CMI-Biofilm pour la pénicilline (Melchior et al 2006)	20
II.9	Sensibilité à la néomycine de différentes souches de <i>St aureus</i> planctoniques vs. en biofilm dans du Mueller Hinton ou du lait (Melchior et al 2006)	21
III.1	Courbe de croissance d'une bactérie	23
III.2	Cycle de formation d'un biofilm (Davies, 2004)	24
III.3	Représentation des étapes de colonisation des surfaces par des microorganismes (Van Loosdrecht <i>et al.</i> , 1990)	31
IV.1	Schéma descriptif des interactions pouvant s'établir entre deux corps et distances pour lesquelles ces interactions sont significatives.	34
IV.2	Comparaison de la microstructure de surfaces neuves de plastique (a) et de verre (b), on remarque que	36
IV.3	Certaines surfaces sont plus «attachantes» que d'autres pour les pathogènes : après 24 heures de contact à 20°C la bactérie <i>Escherichia coli</i> se fixe beaucoup plus au plastique (a) qu'à l'acier inoxydable (b).	36

IV.4	Double couche électrique au voisinage d'une surface chargée	40
IV.5	Interactions stériques dues à la présence de chaînes de polymères adsorbées sur deux particules. (a) répulsion : la densité surfacique est élevée, la répulsion stérique est dominante. (b) attraction : la densité surfacique des polymères adsorbés est faible et les chaînes sont suffisamment longues pour s'adsorber simultanément sur plusieurs surfaces, générant ainsi une attraction par pontage.	44
IV.6	Représentation schématique des énergies interfaciales mises en jeu lors de l'adhésion d'un microorganisme (M) en suspension dans un liquide (L) à un support (S). (a) pas d'adhésion (b) adhésion.	48
V.1	Production des curli dans une Bactérie E.Coli K12 en cours de division	56
V.2	Synthèse des EPS (Acide colanique pour Escherichia coli)	59
VI.3	Photo de microscopie électronique à balayage d'un biofilm formé par C. albicans sur un cathéter vasculaire implanté sur un rat. L'épaisseur du biofilm est d'environ 200 µm. On peut voir les blastopores et les hyphes inclus dans la matrice. (Nett and Andes, 2006).	63
VI.4	Principe général de l'AFM. (D'après Dufrêne, 2002).	64

Liste des tableaux de la partie I

N° tableau	Titre	page
II.1	Liste partielle des infections humaines dues aux biofilms (Costerton, 2001).	15
III.1	Facteurs impliqués dans la formation des biofilms (Wimpenny <i>et al.</i> , 2000).	29
VII.1	Les caractères qui différencient les entérocoques et les streptocoques D	68

Liste des Figures de la partie II

N° figure	Titre	Page
II.1	Coloration de la biomasse fixée d' <i>Entérocooccus faecalis</i> au cristal violet	76
II.2	Récupération de la biomasse fixée d' <i>Entérocooccus faecalis</i> à l'aide d'un mélange Acétone-Ethanol	76
II.3	Biomasse adhéree pour différentes concentrations en CaCl ₂	77
II.4	Aspect des colonies sur gélose M17	77
II.5	Aspect des colonies sur gélose au sang frais 2.	78
II.6	Aspect microscopique de la souche après coloration de Gram	79
II.7	Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 Strep	79
II.8	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i> dans le polystyrène en aérobiose dans du M17 en fonction du pH	80
II.9	Taux d'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en aérobiose dans le bouillon M17 sur le polystyrène en fonction du pH	80

II.10	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose dans du le bouillon M17 en fonction du pH sur le polystyrène	81
II.11	Taux d'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose dans le bouillon M17 en fonction du pH sur le polystyrène	82
II.12	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose dans des tubes en verre utilisé en fonction du pH	83
II.13	Taux d'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose dans des tubes en verre utilisé en fonction du pH	83
II.14	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose dans du bouillon M17 en fonction du pH dans des tube en verre neuf	84
II.15	Taux D'Adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose dans du M17 dans des tube en verre neuf en fonction du pH	85
II.16	Comparaison de l'Adhésion d' <i>E.faecalis</i> sur le verre et le polystyrène dans du M 17 en anaérobiose et en fonction du pH	85
II.17	Comparaison de l'Adhésion d' <i>E.faecalis</i> sur le verre neuf et le polystyrène dans du M 17 en anaérobiose et en fonction du pH	86
II.18	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i> sur le polystyrène dans du M 17 en anaérobiose en fonction de la concentration en CaCl ₂	87
II.19	Taux d'adhésion d' <i>E.faecalis</i> sur le polystyrène dans du M 17 en anaérobiose et en fonction de la concentration en CaCl ₂	88
II.20	Séparation des deux phases : organique et aqueuse après décantation.	89

Liste des tableaux de la partie II

N° tableaux	Titre	Page
II.1	Résultats de la croissance et de l'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en aérobiose dans des tubes en polystyrène.	79
II.2	Résultats de la croissance et de l'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en fonction du pH en anaérobiose sur le polystyrène.	81
II.3	Résultats de la croissance et de l'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en fonction du pH en anaérobiose sur le verre utilisé.	83
II.3	Résultats de la croissance et de l'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose sur le verre neuf	84
II.4	Résultats de la croissance et de l'adhésion d' <i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose sur le polystyrène en fonction de la concentration de CaCl ₂	87

SOMMAIRE

Liste des Figures et des tableaux

Introduction générale01

Partie I : Revue de la littérature sur les biofilm

Chapitre I : Généralité sur les biofilms.....03

Introduction03

I. Généralités sur les biofilms05

I-1- Définition d'un biofilm05

I-2- Condition de formation07

I-3- Intérêt pour la survie07

I-4- Intérêt de l'étude des biofilms08

I-5 -Outils d'analyse des biofilms08

Chapitre II : Lieux d'existence des biofilms10

II-1- Dans la nature10

II-2- dans l'industrie11

II-3- Dans les réseaux de distribution d'eau potable11

II-4- Systèmes de climatisation et tours aéroréfrigérantes.....14

II - 5 - Dans le monde médical14

II - 5 - 1- Biofilm: une cause d'infection chronique.....16

II - 5 - 2- Biofilm: test de sensibilité.....20

Chapitre III : La formation du biofilm.....22

III-1- Les conditions de croissance.....22

III-2- Le développement du biofilm (organisation du biofilm)24

III-2-1-Phase I : Film initiateur et approche de la surface.....26

II-2-2- Phase II : Adhérence, adhésion et site d'initiation27

II-2-3- Phase III : Maturation du biofilm29

II-2-4-Phase IV : Le détachement.....31

Chapitre IV – Influence des propriétés de surface sur la formation du biofilm33

Introduction..... 33

IV- 1- Rugosité.....35

IV- 2- Hydrophobicité.....36

IV- 3- Charge de la surface.....39

IV- 4 - Forces d'interactions39

A-Interactions électrostatiques	39
B-Interactions non électrostatiques	41
1) Interactions polaires liées aux forces de van der Waals.....	41
a)Interaction de Keesom entre dipôles	42
b) Interaction de Debye entre dipôle et dipôle induit.....	42
c) Interaction de London (ou de dispersion) entre dipôles induits.....	42
2) Interactions polaires.....	43
a)Liaison hydrogène	43
b) Répulsion hydrophile.....	43
c)Attraction hydrophobe	43
3) Interactions stériques.....	45
IV-5-Les théories	45
A- La théorie DLVO appliquée à l'étude de l'adhésion des microorganismes	45
B- La thermodynamique des surfaces : application à l'adhésion Microbienne	49
1) Calcul des énergies de surface des trois entités (microorganisme, support, milieu de suspension)	50
2) Calcul de ΔG_{adh}	51
C-La théorie DLVO étendue	52
Chapitre V- Acteurs moléculaires au sein du biofilm.....	53
V-1- Les facteurs de mobilité et d'adhérence	54
V-1-1- Le flagelle.....	54
V- 1- 2- Les pili	54
V-1-3- Les fimbria et les curli	55
V-2- Les facteurs de différenciation.....	57
V-2-1- Le quorum sensing	57
V-2- 2- Les polysaccharides et la matrice	57
V- 2- 3- L'alginate	59
V- 2- 4- Adaptation phénotypique	60
CHPITREVI : Méthodes de quantification de l'adhésion.....	61
Introduction	61
VI -1-Méthode par immersion.....	61
A – Principe.....	61
B – Limites.....	61
VI -2-Les microplaques	62
VI-3-La microscopie électronique à balayage	62

VI -4-La microscopie confocale.....	63
VI -5-La microscopie à force atomique.....	64
VI -6-Les pinces optiques.....	65
VI -7-Les chambres à écoulement.....	66
VI -8- la méthode du cristal violet.....	66

CHPITRE VII :Le genre <i>Entérocooccus</i>	67
VII-1- Caractères bactériologiques	68
VII-2- Habitat - pouvoir pathogène chez l'homme	68
VII-3- Méthodes d'analyse	69
VII - 4-Diagnostic bactériologique.....	70
VII-5- Adhésion et pathogénicité d' <i>Enterococcus faecalis</i>	69
VII-6- Traitement	70

Partie II: Etude expérimental

I- Matériel et méthodes	71
I-1- Modèle biologique.....	71
II-Méthodes	71
II-1- Isolement d'<i>Enterococcus faecalis</i>	71
II-1- 1- Prélèvement des échantillons	71
II -1- 2- Isolement et purification	72
II -1- 3 - Identification de la souche	72
II- 2 -Protocole de l'adhésion et de quantification	72
II- 2 -1- Adhésion	72
II- 2 -2 - Quantification de la biomasse fixée (Méthode du cristal violet)...	73
II-3- Détermination de l'hydrophobicité d'<i>Entérocooccus faecalis</i>	73
II-4- Effet du pH sur l'adhésion d'<i>Ec.faecalis</i>	74
II-5- Effet de CaCl₂ sur l'adhésion d'<i>Ec.faecalis</i>	76
II-Résultats et discussions	77
II-1- Résultats de l'isolement et purification	77
II-2- Identification de la souche	78

1- Coloration de gram.....	78
2- Test de catalase.....	78
II-3- Résultat de l'adhésion d'<i>Ec.faecalis</i> en aérobiose en fonction du pH sur le polystyrène	79
II-4- Résultat de l'adhésion d'<i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose sur le polystyrène en fonction du pH	81
II-5- Résultat de l'adhésion d'<i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose sur le verre utilisé en fonction du pH	82
II-6- Résultat de l'adhésion d'<i>Ec.faecalis</i> en anaérobiose sur le verre neuf en fonction du pH	84
II-7- Résultat de l'adhésion en présence de CaCl₂.....	87
II-8 -Mesure de l'hydrophobicité d'<i>Ec.faecalis</i>.....	88
III-3-Discussion.....	89
Conclusion.....	95
Références bibliographiques	96

Introduction générale

En conditions naturelles, les microorganismes se développent préférentiellement sur une surface plutôt qu'en suspension ; aucun métal (excepté le cuivre qui est toxique), ni plastique ne résiste à la colonisation bactériennes.

Les bactéries se trouvant dans un biofilm sont résistantes aux agents extérieurs tels que les ultra-violets, les agents antibactériens (désinfectants), la chaleur, les bactériophages. Ces biofilms sont des réservoirs de différentes espèces bactériennes.

Les biofilms posent des problèmes dans des domaines très divers : en médecine, dans le domaine maritime, les canalisations, les industries agroalimentaires. Un biofilm peut se mettre en place dans quelques heures, et permettre ainsi aux bactéries qui s'y trouvent de devenir résistantes aux agents extérieurs.

La dégradation de la qualité microbiologique de l'eau en réseau de distribution est également influencée par la présence de bactéries qui se développent sur la surface interne du réseau de distribution de l'eau. Ces bactéries ne croissent ni meurent en présence d'agents antimicrobiens.

L'étude des mécanismes moléculaires qui permettent la formation des biofilms devrait permettre de mieux maîtriser les développements pharmaceutiques et technologiques visant à prévenir ou à éradiquer leur formation.

La mise en place d'un biofilm s'effectue en plusieurs étapes, l'adhésion est l'une des premières étapes pour la mise en place de ce biofilm. Elle est influencée par l'hydrophobicité des germes, variable selon les espèces et l'état physiologique du germe concerné, par les substances polymériques extracellulaires produites par les bactéries, par les propriétés de surface, et le milieu dont elles se trouvent.

Ce travail consiste à étudier l'influence du pH et la force ionique sur l'adhésion bactérienne. Le modèle biologique utilisé dans notre étude est la bactérie *Enterococcus-Faecalis*. On a travaillé sur deux matériaux le verre et le polystyrène.

Ce mémoire est subdivisé en deux parties principales:

Partie I : C'est la partie théorique consacrée à une synthèse bibliographique sur les biofilms. Dans cette partie on a exposé l'essentiel sur les biofilms bactériens, leurs impacts sur l'environnement, et leurs intérêts.

Partie II: c'est la partie expérimentale consacrée à l'étude de l'adhésion d'*Enterococcus-Faecalis* La partie I est subdivisée en sept chapitres:

Chapitre 1: Généralité sur les biofilms.

Chapitre II: Lieux d'existence des biofilms.

Chapitre III : La formation du biofilm.

Chapitre IV : Influence des propriétés de surface sur la formation du biofilm.

Chapitre V: Acteurs moléculaires au sein des biofilm.

Chapitre VI : Méthodes de quantification de l'adhésion.

Chapitre VII : Le genre *Entérocooccus*.

Dans La partie expérimentale on a présenté le matériel et les méthodes, ainsi que les résultats et discussions, et enfin une conclusion.

Partie I

***Revue de littératures sur les
biofilms***

Introduction

La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental (état planctonique). L'état planctonique pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à l'autre. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de « biofilm » (Costerton et al., 1999)

La formation des biofilms est une stratégie de survie universelle. Les biofilms sont ubiquitaires (Dune et al., 2002). Ils se forment sur les supports inertes et vivants dans les installations industriels, et sur les instruments médicaux (Dune et al., 2002; Drenkard et al., 2002). En particulier, les microorganismes organisés en biofilms sont beaucoup plus résistants aux agents antimicrobiens que les microorganismes planctoniques (Pedersen et al; 1992).

Les microorganismes aquatiques sont capables de se réorganiser en biofilms, quand les conditions environnementales changent et mettent leurs vies en risque. Les biofilms permettent aux bactéries de demeurer dans les conduites d'eaux sans être éliminées par les biocides (Habash et al., 1999).

Les biofilms sont hétérogènes, car ils sont formés par différentes espèces de bactéries, qui se développent sur la surface interne des conduites du réseau de distribution de l'eau. La colonisation des canalisations des réseaux de distribution d'eau potable est également un problème majeur, malgré l'addition de biocide. L'ajout de chlore permet d'obtenir des comptages bactériens en dessous des limites sanitaires, mais les bactéries protégées au sein du biofilm sont toujours viables (Costerton et Lappin-Scott, 1989). Les biofilms se forment également sur la coque des navires Il s'agit d'une énorme communauté de cellules bactériennes qui sont liées tout le long d'une matrice organique par des polymères qui rentrent dans la composition de la bactérie (Gharacklis et al., 1990; Lappin-Scott et al., 1995).

Cet arrangement offre plusieurs avantages à la bactérie :

1. facilité d'avoir ces nutriments,
2. améliorer son activité,
3. simulation des interactions bactériennes,

4. lui offre plus de protection contre les agents toxiques (Davis et al).

L'intérêt croissant porté à l'étude des biofilms depuis maintenant plus de 30 ans trouve ses origines dans 2 problématiques :

- 1 Les bactéries constituant le biofilm sont extraordinairement résistantes aux stress environnementaux et aux biocides, en particulier aux antibiotiques. Elles sont ainsi à l'origine de certaines maladies nosocomiales et d'infections chroniques.
- 2 L'ubiquité des biofilms remet en cause la projection *in vivo* d'une partie des connaissances accumulées *in vitro* depuis Pasteur et l'émergence de la microbiologie. En effet, ces connaissances sont basées exclusivement sur l'étude des bactéries en suspension dans un milieu souvent riche.

I. Généralités sur les biofilms

Les micro-organismes sont, à tort, perçus comme des organismes simples. Leur étude démontre quotidiennement l'inverse et révèle leur extraordinaire potentiel d'adaptation. Outre l'état de suspension, les micro-organismes, et plus particulièrement les bactéries, présentent de nombreuses formes de vie ou de survie : l'état viable mais non cultivable, la sporulation et les biofilms.

Le mode de vie en biofilm est l'une des deux modalités de vie des organismes unicellulaires. Ce serait le mode de vie naturel de la plupart des microorganismes, notamment en milieu hostile.

L'autre mode de vie est la flottation libre de type dit « planctoniques » dans un milieu liquide.

La structure et la physiologie du biofilm donne aux bactéries ce que l'organisation tissulaire apporte aux cellules des êtres supérieurs.

I-1-Définition du biofilm

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

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

On peut donc définir simplement les biofilms comme des agrégats de microcolonies bactériennes fixées à un support et engluées dans leurs propres exopolymères formant une matrice (Figure I.1) ; les bactéries ne représentant que 10 à 25% en masse du biofilm. La matrice d'exopolysaccharide, représente quelque 85 %

du volume total. Cette matrice renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. Au sein du biofilm, les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et, d'autre part, d'évacuer les déchets. Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'exopolysaccharide et être utilisé par les bactéries. Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un micro-environnement anaérobie. Cette observation conforte l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure.

La définition d'un biofilm peut légèrement varier selon les sources: certains auteurs choisissent par exemple d'exclure du terme "biofilm" les communautés bactériennes ne produisant pas leur propre matrice extracellulaire.

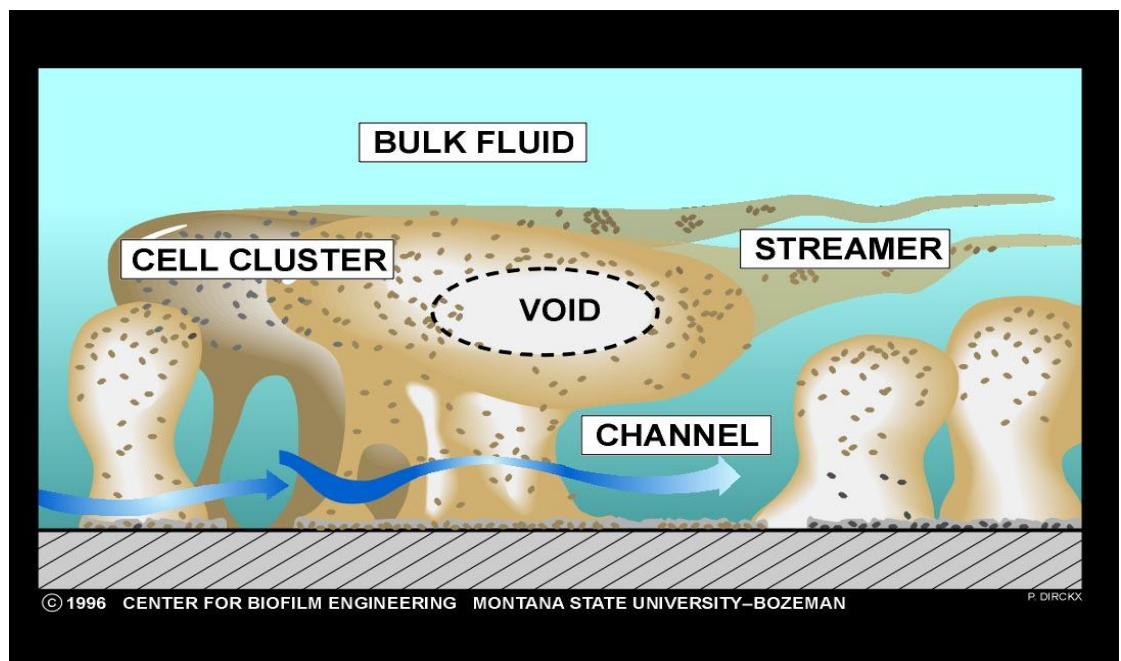


Figure I.1. Aspect d'un biofilm mature
Center For Biofilm Engineering Montana State University-Bozeman

I-2- Condition de formation du biofilm

La formation de biofilm est une réponse à des signaux environnementaux qui va se traduire chez les bactéries du biofilm, dites sessiles, par un certain nombre de modifications génotypiques. Celles-ci induisent des bouleversements phénotypiques et métaboliques chez les bactéries sessiles comparativement à leurs homologues en suspension (dits planctoniques) (Costerton *et al.*, 1999; Davey and O'Toole G, 2000; Ramsey and Whiteley, 2004; Branda *et al.*, 2005). Un des exemples très illustratif de ces modifications concerne la résistance aux antibiotiques. Les bactéries d'un biofilm peuvent en effet être jusqu'à 1000 fois plus résistantes à certains antibiotiques que ces mêmes cellules en culture planctonique (Mah and O'Toole, 2001).

Le biofilm bactérien paraît alors comme une structure complexe et dynamique, aussi bien au niveau de son organisation qu'au niveau de sa capacité à s'adapter rapidement aux changements de l'environnement (Costerton *et al.*, 1999; Stanley and Lazazzera, 2004).

I-3- Intérêt pour la survie

Les bactéries trouvent généralement un intérêt à vivre et à croître sous forme de biofilms (Brown *et al.*, 1998). plusieurs études ont appuyé l'idée que les différences entre cellules planctonique et celles présente dans un biofilm venaient essentiellement de la disponibilité des nutriments pour les cellules dans les deux cas (Davies, 2000).

Flemming, en 1993, a regroupé ce qu'il considère comme des avantages d'un mode de croissance sous forme de biofilm:

- Symbiose;
- Utilisation de substrats moins facilement biodégradables par des organismes spécialisés par exemple dégradation de la cellulose ou, nitrification;
- Création de niches écologiques par exemple des zones anaérobies dans les environnements aérobies, des compartiments riches en nutriments dans les systèmes oligotrophes.

I-4 - Intérêt de l'étude des biofilms

Dans de nombreux cas les biofilms ont toutefois des effets positifs, ou même vitaux en ce qui concerne les biofilms physiologiques par exemple (colonisation de tractus intestinal ou de la surface des racines et des feuilles de plantes). Ils sont également des agents géochimiques importants dans les environnements de surface, en agissant sur les transformations et les flux de matière aux interfaces liquide-solide et dans la formation ou l'altération des minéraux. La capacité à dégrader le support sur lequel les biofilms se développent est mise à profit dans les procédés de biolixiviation, qui utilisent l'attaque microbienne des minéraux pour mettre en solution les ions souhaités. La capacité des biofilms à transformer leur milieu est aussi couramment mise en œuvre pour la dépollution des effluents aqueux.

Les propriétés particulières des bactéries immobilisées sont utilisées depuis plus d'un siècle. Ainsi, dès 1823, Schuetzenbach envisagea d'utiliser des copeaux de hêtre pour adsorber des micro-organismes et produire du vinaigre et Pasteur développa le premier système à cellules immobilisées, dans le procédé « Pasteur » ou « Orléans » pour la production de vinaigre. L'immobilisation cellulaire consiste à confiner des cellules microbiennes dans un espace restreint afin d'obtenir une biomasse active à haute densité (Karel *et al.*, 1985). Contrairement aux systèmes utilisant des cellules en suspension, cette technologie permet d'augmenter la productivité grâce à l'aspect continu des opérations, à la haute densité cellulaire maintenue dans les réacteurs et à la réutilisation des biocatalyseurs (Groboillot *et al.*, 1994). De plus, l'immobilisation cellulaire limite les risques de contamination (Champagne *et al.*, 1994) et augmente la stabilité plasmidique (Huang *et al.*, 1996). De nos jours, les bioréacteurs à cellules immobilisées sont légion et leur utilisation très répandue. L'immobilisation des bactéries est réalisée par rétention sur membrane, par attachement à des surfaces, par inclusion dans des matrices poreuses et par encapsulation.

I-5 -Outils d'analyse des biofilms

Les outils classiques de la microbiologie, exigeant prélèvement et culture, sont le plus souvent inefficaces pour l'analyse des biofilms car l'extraction des micro-organismes du biofilm entraîne des modifications métaboliques importantes et, le plus

souvent, ne permet d'isoler qu'une partie minoritaire des organismes présents dans les biofilms. Les analyses pertinentes doivent obligatoirement être réalisées in situ. L'apparition d'équipements de laboratoire tels que la microscopie confocale à balayage laser et la cytométrie de flux a permis des avancées remarquables, notamment grâce au couplage avec les outils de la biologie moléculaire (techniques FSH, GFP, marqueurs de viabilité cellulaire...). Néanmoins ces équipements sont chers et la conception de nouveaux outils de recherche reste un champ d'investigation ouvert. La conception de capteurs utilisables sur des sites industriels (robustes, en ligne, en continu, avec un minimum de maintenance...) ou des environnements difficiles (sols, aquifères, organismes vivants...) constitue un enjeu économique majeur.

II- Lieux d'existence des biofilms

Zobell, en 1943, montra qu'il y avait plus de bactéries vivantes sur les surfaces d'un récipient que dans le liquide qu'il contient. Les microbiologistes admettent désormais que plus de 99% des bactéries présentes dans l'environnement, le milieu industriel ou médical vivent sous la forme de biofilms. Cependant, ce nouvel aspect de la microbiologie, redécouvert en 1977 (Geesey *et al.*, 1977), n'est encore que très peu abordé dans l'enseignement supérieur.

II-1- Dans la nature

Les biofilms sont principalement pluri-espèces et sont trouvés dans les ruisseaux, les lacs et autres milieux aquatiques (Geesey *et al.*, 1977). De ces environnements sont extraits des boues utilisées dans certaines méthodes de dépollution (Borsodi *et al.*, 1998). A titre d'exemple, citons l'étude du lac Fertő à la frontière entre l'Autriche et la Hongrie. Les boues qui y sont extraites sont composées de 493 souches bactériennes et que sur les 296 étudiées, la majorité est aérobie avec une grande proportion de *Micrococcus* et de *Pseudomonas*.

Les biofilms pluri-espèces sont de véritables consortiums où chaque espèce y trouve son avantage. Ainsi, plusieurs espèces bactériennes, chacune équipée de différents systèmes enzymatiques, peuvent métaboliser ensemble certains nutriments que chacune d'elles, prise individuellement, ne peut utiliser. Cette coopération est d'ailleurs à la base de l'utilisation de certains biofilms dans des procédés industriels. La formidable capacité de survie des bactéries adhérentes est illustrée par la diversité des niches écologiques colonisées par les biofilms.

Ainsi, on les retrouve dans des failles océaniques à 3500 mètres de profondeur et à -0,7°C (Thorseth *et al.*, 2002) mais aussi, selon certains chercheurs de la NASA, sur Mars. L'examen des météorites provenant de Mars et Nakhla révèle en effet la présence de biofilms à *cocci* identiques à ceux trouvés dans des fossiles terrestres (Gibson *et al.*, 2001). La particularité de ces biofilms est une forte concentration en fer et en manganèse dans leur matrice.

II-2- Dans l'industrie

Dans le monde industriel, deux aspects du biofilm sont rencontrés : un aspect négatif, nocif voire dangereux, et un aspect positif. Ce dernier est illustré par les systèmes de dépollution des eaux usées.

A l'inverse, les biofilms peuvent poser des problèmes majeurs aux industriels. Ainsi, dans l'industrie pétrolière, la colonisation des systèmes d'injection d'eau par des bactéries productrices de soufre peut entraîner une acidification du pétrole et le rendre inutilisable, conduisant à une possible fermeture du champ pétrolifère. Les biofilms se forment également sur la coque des navires (phénomène de « biofouling », figure II.1), ce qui entraîne une augmentation du tirant d'eau, donc une réduction de la vitesse des navires et une augmentation de la consommation en fuel. Certains biofilms composés de plusieurs espèces (notamment les bactéries sulfo-réductrices) peuvent également corroder le métal et engendrer des trous profonds de 2,5 cm en 6 mois.

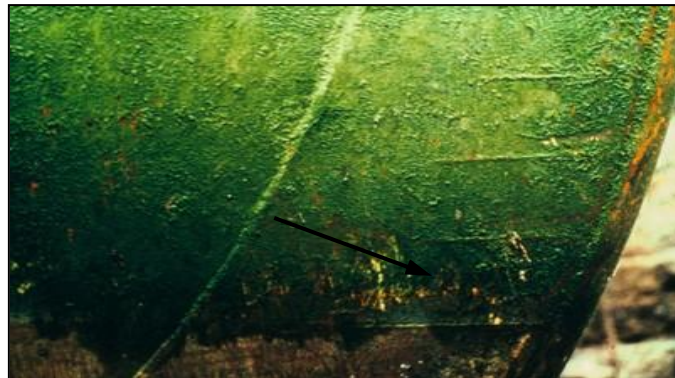


Figure II.1. Phénomène de biofouling sur la coque d'un navire. Le biofilm bactérien est recouvert par une couche de micro-algues, de champignons et d'invertébrés. Ici la coque est totalement recouverte par l'algue verte *Enteromorpha* (photo, Dr M.E. Callow, <http://www.biosciences.bham.ac.uk>).

II-3- Dans les réseaux de distribution d'eau potable

La colonisation des canalisations des réseaux de distribution d'eau potable est également un problème majeur, malgré l'addition de biocide. L'ajout de chlore permet d'obtenir des comptages bactériens en dessous des limites sanitaires, mais les bactéries protégées au sein du biofilm sont toujours viable (Costerton et Lappin-Scott, 1989).

Les réseaux de distribution d'eau potable sont continuellement exposés à un flux de matière organique biodégradable et de microorganismes allochtones (bactéries, champignons, protozoaires...), provenant de l'usine de traitement des eaux, mais aussi d'incidents (cassures / réparations) sur le réseau lui-même. Une partie de ces microorganismes (bactéries hétérotrophes en particulier) s'adapte à cet environnement ultra-oligotrophe même en présence de chlore, et peut ainsi coloniser l'ensemble d'un réseau de distribution d'eau. Les microorganismes adhèrent, se multiplient et bénéficient d'un avantage nutritif réel (Bryers et al., 1987), et d'une protection contre les agents oxydants dont la diffusion est limitée au niveau de l'interface eau-matériau au travers de la couche limite (Block et al., 1997) (Figure II.3).

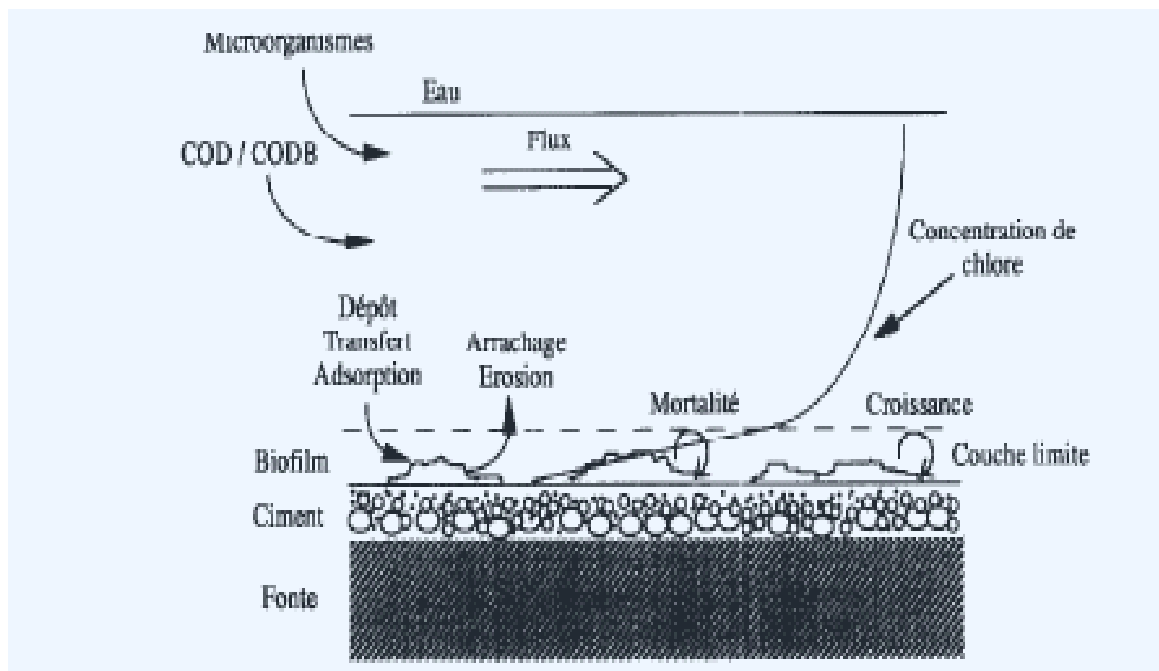


Figure II.3 .Représentation schématique de la section longitudinale d'une canalisation d'un réseau de distribution d'eau potable montrant l'accumulation du biofilm sur la surface interne de cette canalisation (d'après Block et all.)

Concernant les réseaux de distributions d'eau, seul le chlore est utilisé comme traitement actuel. Toutefois l'éradication par chloration des microorganismes présents dans les réseaux d'eau potable est extrêmement difficile pour au moins trois raisons:

1. l'impossibilité d'appliquer des doses très élevées de désinfectant, incompatibles avec la stabilité des matériaux et les qualités organoleptiques de l'eau (potabilité) ;
2. la diffusion limitée de l'oxydant au sein des biomasses agrégées en suspension dans l'eau ou fixées aux parois (microcolonies, biofilms) ;
3. Le développement de résistance des microorganismes aux oxydants dans les biofilms.



Figure II.4. Représentation d'un biofilm développé dans une canalisation d'eau potable (PR-Company GmbH, 2004)

La formation d'un biofilm sur les parois de canalisation des eaux usées peut réduire considérablement les débits.

II-4- Systèmes de climatisation et tours aéroréfrigérantes

Tous comme les systèmes de distribution d'eau, ces systèmes peuvent être le lieu de proliférations microbiennes notamment sous forme de biofilms. Or il est maintenant connu que les tours aéroréfrigérantes (dispositifs permettant d'évacuer la chaleur produite par les systèmes de climatisation et installés à l'extérieur des bâtiments) peuvent être colonisées par exemple par les légionelles. La prévention de la légionellose est l'objet de plusieurs mesures de santé publique visant à améliorer la qualité de l'eau dans les établissements publics et à améliorer l'entretien des tours aéroréfrigérantes. Dans ce secteur, un marché économique important s'ouvre concernant la recherche et la découverte de nouvelles molécules permettant la limitation ou l'éradication des biofilms dans ces systèmes d'aération.

II - 5 - Dans le monde médical

La plaque dentaire est un exemple classique de biofilm dans le milieu médical. Elle est définie comme une gangue hétérogène adhérant à la surface des dents ou logée dans l'espace gingivo-dentaire. Elle est composée d'une communauté microbienne riche en bactéries aérobies et anaérobies, enrobée d'une matrice intercellulaire d'origine microbienne et salivaire (Mouton *et al.*, 1999). Sa masse varie, selon l'hygiène dentaire, de 5 à 200 mg. Elle contient de 10^8 à 10^9 Unités Formant Colonie (UFC)/mg et est composée de plus de 500 espèces dont 300 ont été identifiées à ce jour. La plaque dentaire est un exemple de collaboration métabolique entre espèces. Ainsi, des bactéries anaérobies prospèrent lorsqu'elles sont physiquement très proches d'organismes aérobies qui appauvrissent l'environnement en oxygène.

La colonisation des poumons des patients atteints de mucoviscidose par *Pseudomonas aeruginosa* est un autre exemple de biofilm rencontré dans le milieu médical.

Les biofilms seraient responsables de plus de 60% des infections nosocomiales (O'Toole *et al.*, 2000 ; Tableau I) et leurs traitements coûteraient plus d'un milliard de dollars US par an. Deux propriétés des biofilms peuvent expliquer leur prédominance dans les maladies nosocomiales ; d'une part, les bactéries en biofilm perdurent dans les milieux les plus hostiles ; d'autre part, la virulence des bactéries semble décuplée par l'immobilisation. Une revue réalisée par Costerton et Lappin-Scott illustre bien la

pathogénicité des bactéries immobilisées : alors que l'injection de 10^6 bactéries en suspension dans le cœur, les poumons ou le péritoine est suivie de leur élimination par le système immunitaire, l'injection de 10^3 bactéries immobilisées suffit pour causer des infections persistantes (Costerton et Lappin-Scott, 1989).

Tableau II.1 : Liste partielle des infections humaines dues aux biofilms (Costerton, 2001).

Infection ou maladie	Espèce(s) impliquée(s)
Infection des sutures	<i>Staphylococcus epidermidis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>
Infection des lentilles de contact	<i>P. aeruginosa</i> et cocci Gram +
Infection des cathéters urinaires	<i>Escherichia coli</i>
Infection des cathéters veineux	<i>S. epidermidis</i>
Infection des valves cardiaques	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>
Caries dentaires	Cocci Gram + acidogènes (<i>Streptococcus</i>)
Otite	<i>Haemophilus influenzae</i> (non typable)
Infection des muscles squelettiques	Cocci Gram + (<i>Staphylococci</i>)
Mucoviscidose	<i>P. aeruginosa</i> et <i>Burkholderia cepacia</i>

En France, une enquête nationale, commandée par le Ministère de la Santé en 1996, montre qu'environ 7% des personnes hospitalisées contractent une infection nosocomiale. Parmi les infections, 36% sont urinaires, 13% pulmonaires et 11% sont localisées sur la zone opérée. Les maladies nosocomiales deviennent de plus en plus une priorité de santé publique, du fait de leur fort taux de mortalité (50% des pneumopathies nosocomiales sont létales) et leur coût (45000 lits sur 550000, problème juridique...), sans parler de l'utilisation des antibiotiques qu'elles entraînent.

Compte tenu de son ubiquité et de ses propriétés extraordinaires, la compréhension du biofilm, de sa mise en place, de son maintien et de son évolution, représente donc un enjeu considérable dans tous les domaines où il est présent, qu'il soit nuisible ou utile.

II - 5 - 1- Biofilm: une cause d'infection chronique

Les bactéries planctoniques peuvent être éliminées par les mécanismes de défense naturels (anticorps, phagocytes...) et elles sont sensibles aux antibiotiques.

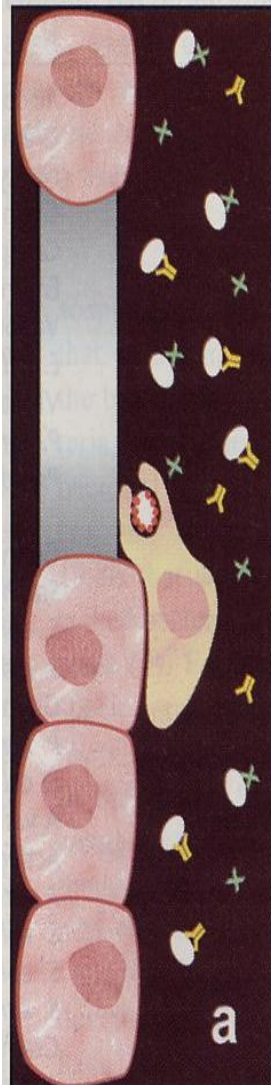


Figure II.5. X Antibiotic Y Antibody  Planktonic cell
 Biofilm cell  Phagocyte enzymes

JW Costerton (1999) Science, 284:1318-1322

Les bactéries peuvent adhérer entre elles pour former un biofilm notamment sur une surface inerte; cette communauté, sessile, est résistante aux anticorps, aux phagocytes et aux antibiotiques



Figure II.6. X Antibiotic Y Antibody Planktonic cell
● Biofilm cell ■ Phagocyte enzymes

JW Costerton (1999) Science, 284:1318-1322

- Les phagocytes sont attirés par les biofilms.
- La phagocytose est inopérante mais les enzymes phagocytaires sont libérées localement



Figure II.7. ✕Antibiotic Y Antibody ◻ Planktonic cell
● Biofilm cell ■ Phagocyte enzymes

JW Costerton (1999) Science, 284:1318-1322

- Les enzymes phagocytaires vont endommager les tissus autour du biofilm et des bactéries planctoniques vont essaimer du biofilm
- Cette libération peut être la cause d'une dissémination de l'infection et d'une infection aiguë dans un tissu voisin



Figure II.8. × Antibiotic Y Antibiotic Planktonic cell
● Biofilm cell ■ Phagocyte enzymes

JW Costerton (1999) Science, 284:1318-1322

II - 5 – 2- Biofilm: test de sensibilité

- Les pathogènes semblent normalement sensibles aux antibiotiques car les techniques conventionnelles ne testent que les bactéries planctoniques
- Nécessité d'une évaluation appropriée de la sensibilité des bactéries

CMIB: CMI du biofilm

(BMIC= Biofilm Minimal Inhibitory Concentration) ,
 • *sensibilité des bactéries libérées par le biofilm.*

CMEB : Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm

(MBEC= Minimal Biofilm Eradication Concentration,)
 • *Sensibilité des bactéries dans le biofilm*

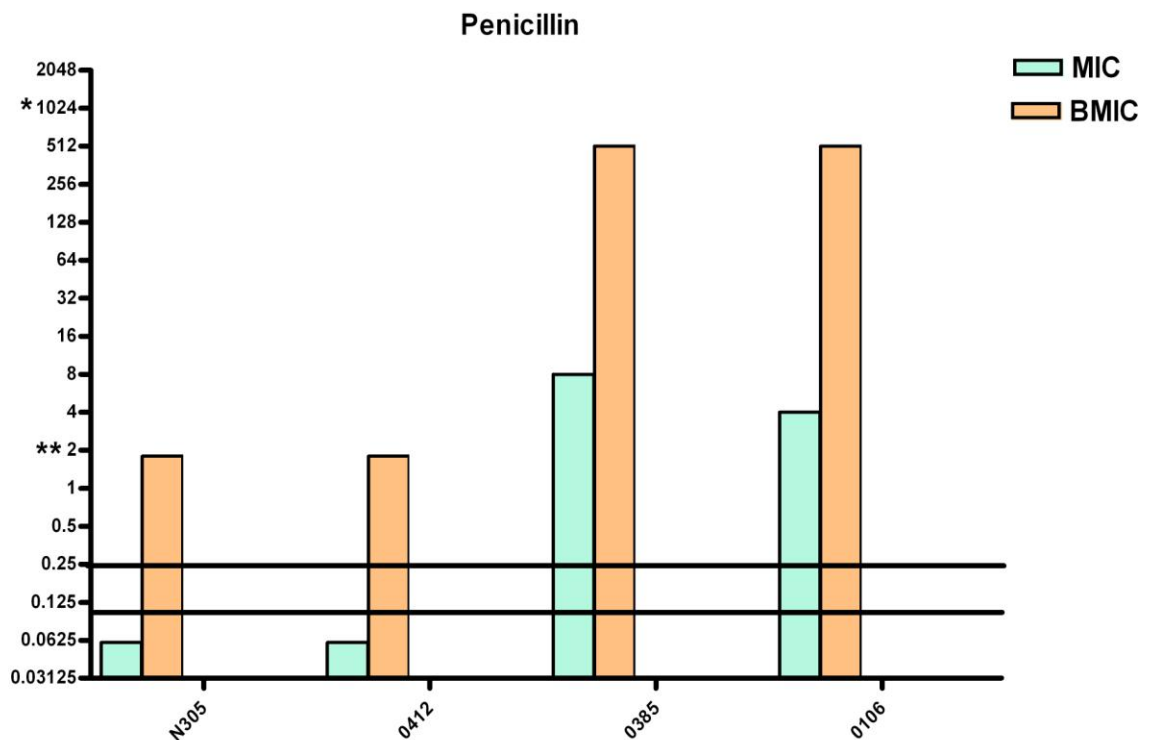


Figure II.9. Différences entre les CMI & CMI-Biofilm pour la pénicilline

(Melchior et al 2006)

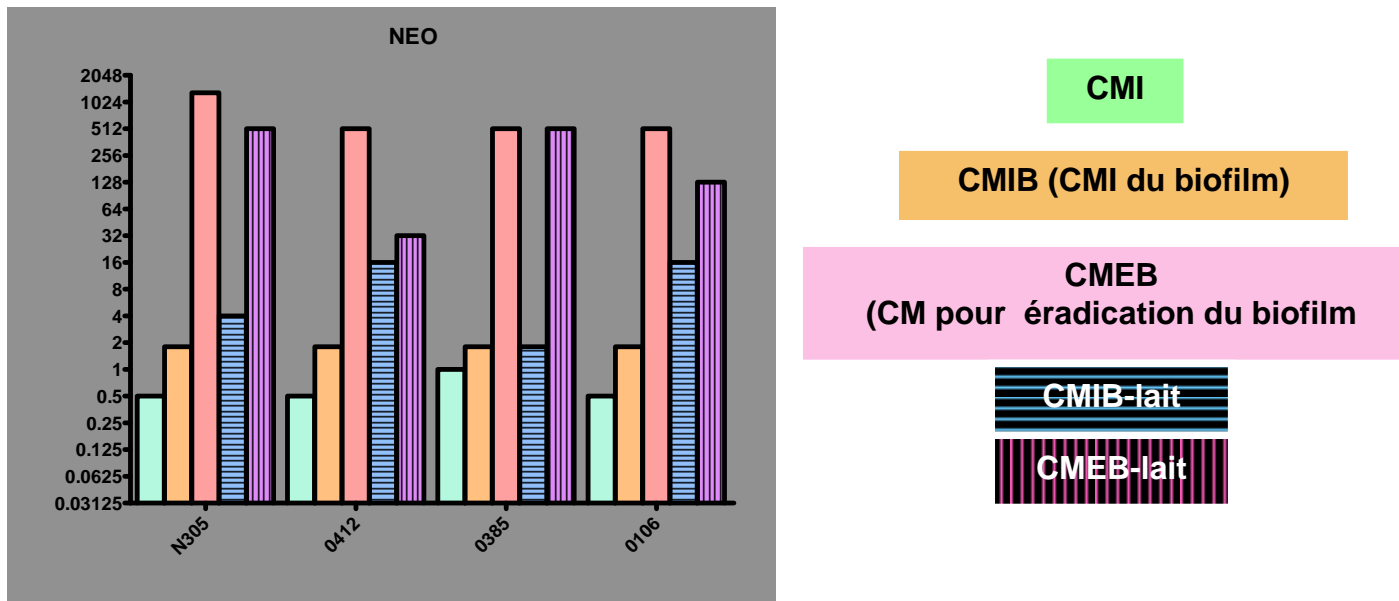


Figure II.10. Sensibilité à la néomycine de différentes souches de *St aureus* planctoniques vs. en biofilm dans du Mueller Hinton ou du lait

(Melchior et al 2006)

III - La formation du biofilm

III - 1 - Les conditions de la croissance

Les exigences essentielles pour la croissance comprennent (a) une provision de nourriture ; (b) une source d'énergie ; (c) de l'eau ; (d) une température appropriée ; (e) un pH approprié ; (f) une teneur appropriée en oxygène.

Les substances nutritives servent de matières premières aux cellules pour leur croissance, leur entretien et leur division. Considérées dans leur ensemble, les bactéries utilisent pour se nourrir une vaste gamme de composés ; ceux-ci incluent divers sucres et hydrates de carbone, des acides aminés, des stérols, des alcools, des hydrocarbures, du méthane, des sels inorganiques et du dioxyde de carbone. Quel que soit l'organisme, les cellules ont besoin de sources de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre et d'oligo-éléments dont est faite la substance vivante.

L'énergie est la source principale des réactions chimiques essentielles qui se déroulent dans une cellule vivante. Les espèces photosynthétiques tirent leur énergie principalement ou exclusivement de la lumière, tandis que les espèces chimiotrophes trouvent la leur en « transformant » des produits chimiques extraits du milieu environnant.

L'eau contribue à la masse d'une bactérie pour 80% ou plus et, au cours de leur croissance, les substances nutritives et les déchets pénètrent et quittent respectivement la cellule, en solution. Par conséquent, les bactéries ne peuvent croître que dans ou sur des matières contenant suffisamment d'eau libre (disponible).

A la *température* optimale de croissance, un type de bactérie donné croît plus rapidement. La vitesse de croissance se réduit lorsque la température s'écarte de cet optimum. Pour toute bactérie, il y a une température maximum et une température minimum au-delà desquelles la croissance s'arrête.

Le pH optimum pour la croissance de la plupart des bactéries se situe aux environs de 7 (pH neutre) et la majorité des espèces ne peuvent se développer dans des milieux très acides ou très alcalins, excepté des *Thiobacillus* supportant un milieu contenant de l'acide sulfurique (H₂SO₄).

On étudie la croissance d'une population en analysant la courbe de croissance d'une culture microbienne. Lorsque des micro-organismes sont cultivés en milieu liquide, ils

se développent habituellement dans un système fermé, culture en « batch » ou discontinue.

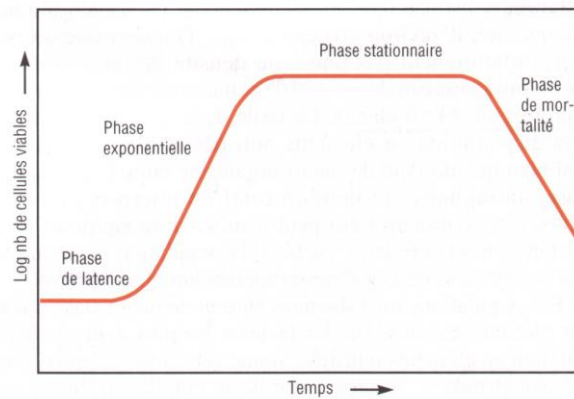


Figure III.1. Courbe de croissance d'une bactérie

Cette croissance s'explique en quatre phases :

- **la phase de latence** pendant laquelle il n'y a pas d'augmentation immédiate du nombre ou de la masse cellulaire. La durée de cette phase varie selon les micro-organismes et la nature du milieu.
- pendant **la phase exponentielle**, les micro-organismes se développent et se divisent à la vitesse maximale possible étant donné leur potentiel génétique, la nature du milieu et les conditions de culture.
- **la phase stationnaire** où la croissance de la population finit par s'arrêter et la courbe de croissance devient horizontale (concentration de bactéries de 10^9 cellules/ml en général). La taille de la population dépend de la disponibilité en éléments nutritifs et d'autres facteurs aussi bien que du type de micro-organisme cultivé.
- Un changement défavorable de l'environnement comme la carence en nutriment et l'accumulation de déchets toxiques conduisent à la diminution du nombre de cellules viables, caractéristique de **la phase de mortalité**.

L'organisation de la vie au sein des biofilms (zones aérobies/anaérobies, gradients de pH, accumulation de métabolites...) dépend à la fois de la structure des

populations microbiennes, de leurs métabolismes, de la structure du biofilm et des transferts internes avec le milieu environnant. Ces ensembles réactionnels hors équilibre sont parfois rendus plus complexes par la nature du milieu. La formation d'écosystèmes, les interactions entre micro-organismes, l'apparition d'espèces pathogènes, le développement de caractéristiques différentes de celles des micro-organismes planctoniques, en particulier les mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants, antibiotiques), sont autant de thèmes fondamentaux qui sous-tendent des problèmes industriels majeurs.

III-2- Le développement du biofilm (Organisation du biofilm)

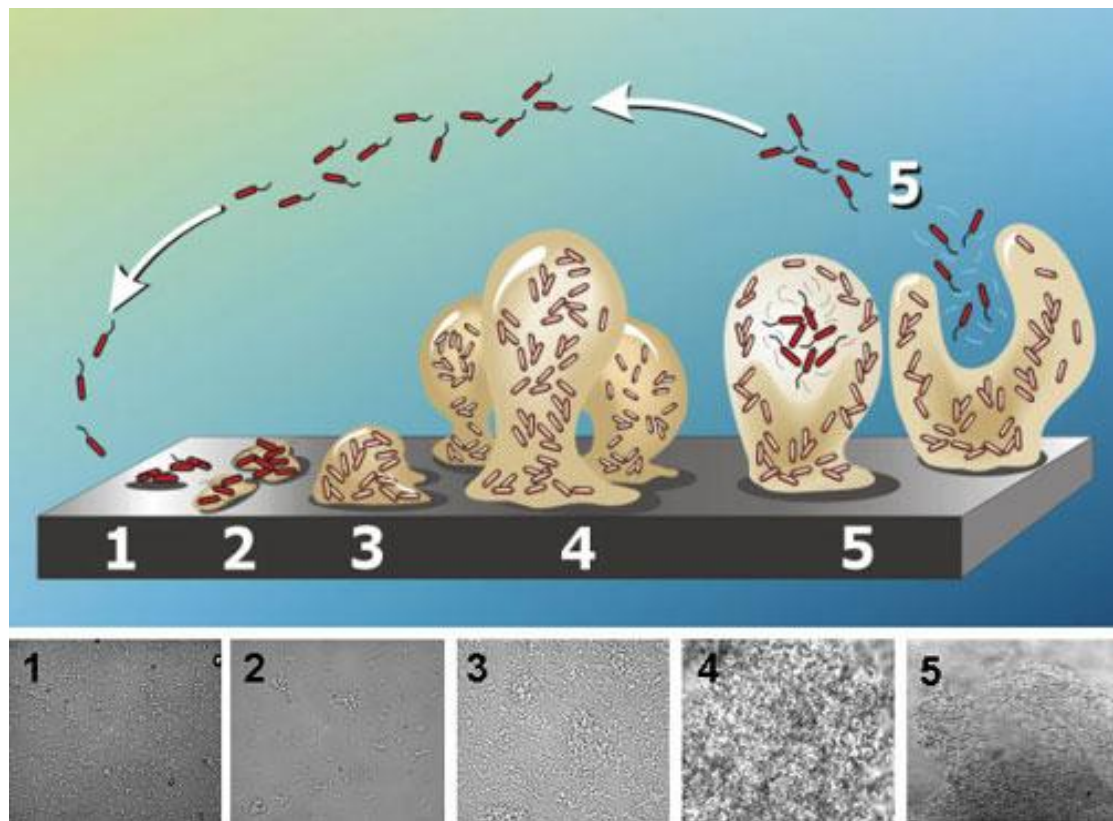


Figure III.2. Cycle de formation d'un biofilm (Davies, 2004)

Lors d'une adhésion irréversible, la bactérie s'adsorbe d'abord sur la surface avant de s'y fixer activement par son activité métabolique. La sécrète une substance -

un polysaccharide appelé glycocalyx - qui lui permettra ensuite de s'encapsuler littéralement sur la surface. Ce type de bioattachement est cellule beaucoup plus lent et dépend du type de bactérie, de l'importance de sa population dans le milieu et de la durée de sa phase de croissance. Cette dernière dépend également du milieu dans lequel se trouve la bactérie : température de la solution, pH, concentration en électrolyte et disponibilité de nutriments.

Bien protégées par le glycocalyx, des microcolonies se forment sur la surface. Leur croissance puis leur confluence aboutit bientôt à la formation d'un enduit mince et superficiel au départ, qui s'épaissit au fur et à mesure de la croissance bactérienne jusqu'à atteindre quelques millimètres d'épaisseur, C'est le biofilm.

Les mécanismes permettant d'aboutir au biofilm mature dépendent des espèces et des surfaces (Costerton et Lappin-Scott, 1989). Cependant, de nombreux auteurs évoquent des étapes clés dans cette formation mais leur nombre reste encore variable et est en perpétuelle discussion. En 1997, Palmer et White définissent deux grandes étapes dans la formation du biofilm : les étapes précoces, faisant intervenir des interactions cellules – cellules et cellules – surfaces, dont les mécanismes moléculaires restent très flous, et les phases tardives dont la fixation définitive de la micro-colonie à la surface. D'autres auteurs décrivent la formation du biofilm comme une phase dans un cycle de développement cellulaire comprenant une étape d'approche, d'adhésion, de colonisation, d'accumulation, de maturation et de dispersion (Jenkinson et Lappin-Scott, 1999). O'Toole, quant à lui, propose 4 grandes étapes : l'initiation, la maturation, la maintenance et la dissolution (O'Toole *et al.*, 2000). Ces différences, minimes certes mais existantes, dans la vision de la formation du biofilm montrent bien la complexité du phénomène et la jeunesse de cette discipline. Les futurs progrès dépendent de l'évolution des techniques, en particulier de la microscopie et de la biologie génomique et post-génomique (Costerton et Lewandowski, 1995).

Le développement du biofilm est un processus très structuré qui aboutit à la formation d'une communauté complexe d'organismes. Pour former ces communautés, les organismes doivent intégrer des messages extérieurs et intérieurs, communiquer entre eux (détection de la densité de population et des espèces) et se coordonner dans le temps. On distingue 4 phases majeures dans la formation du biofilm : le

conditionnement et l'approche de la surface, la fixation à la surface et la maturation du biofilm, chacune de ces phases étant sub-divisée en différentes étapes.

III -2-1- Phase 1 : Film initiateur et approche de la surface

1-Film initiateur

De façon logique, la colonisation d'une surface implique deux partenaires : la surface et la bactérie. Chacun de ces partenaires doit présenter un certain nombre de caractéristiques pour que la colonisation ait lieu. Théoriquement, toute surface est colonisable. Cependant, la formation d'un « film initiateur » sur cette surface semble indispensable pour la colonisation. Cette notion de film initiateur était déjà évoquée par Zobell en 1943. Ce film est composé de matières organique et minérale s'adsorbant sur la surface (Trulear et Characklis, 1982). Son épaisseur varie de 0,1 à 1 µm (Mouton *et al.*, 1999). Il est requis pour le futur attachement bactérien (Fletcher, 1980) mais son importance n'est pas quantitative (Apilanez *et al.*, 1998).

Le dépôt de glycoprotéines salivaires sur la dentine est un exemple de film initiateur. Ce dernier apparaît quelques minutes après le polissage et permet la formation de la plaque dentaire. Le rôle de ses glycoprotéines consisterait à neutraliser les excès de charges et d'énergie libre de surface qui limiteraient l'adhésion (Roques, 2000). La nature et l'importance du film initiateur sont liées aux propriétés du milieu. Les bactéries à Gram négatif, à l'exception de *Myxococcus xanthus* et d'*E. coli* O517:H7, forment des biofilms dans les milieux les moins carencés. Certaines souches d'*E. coli* K-12 et de *Vibrio cholerae* ne forment pas de biofilm dans un milieu minimal sauf s'il est enrichi en acides aminés. Au contraire, *E. coli* O517:H7 ne forme un biofilm que dans un milieu pauvre en nutriment (O'Toole *et al.*, 2000) ; plus le milieu est pauvre, plus le film sera attractif pour la bactérie.

2- Approche de la surface

L'étape initiale d'attachement fait intervenir des appendices générateurs de mouvement qui permettent d'approcher la surface à coloniser (O'Toole GA, et Kolter 1998), Cette approche conduit à un attachement transitoire pendant lequel la bactérie va chercher à « évaluer » la surface sur laquelle elle se trouve.

Trois forces sont impliquées dans l'approche de la bactérie vers la surface conditionnée : les forces hydrodynamiques, le chimiotactisme et les interactions

hydrophobes (Roques, 2000). Les forces hydrodynamiques regroupent l'attraction, la friction, l'écoulement, la convection, la sédimentation et les mouvements browniens. Ces forces vont permettre à la bactérie de s'approcher du support de façon aléatoire. La convection et la sédimentation, quant à elles, permettent le déplacement des bactéries sur de « longues distances ».

Un gradient de nutriments peut aussi s'instaurer entre le support et le milieu environnant, induisant un chimiotactisme. Les molécules attractives sont classiquement les oses et les osamines. La bactérie est pourvue de récepteurs membranaires sensibles à la concentration en nutriment. Dans cette phase, un élément majeur intervient : le flagelle. Il permet à la bactérie de lutter contre les forces de répulsion (Stickler, 1999). Des forces physiques sont impliquées dans l'attraction ou la répulsion électrostatique de la bactérie vers/envers la surface. La nature chargée des surfaces attire les polymères solubles formant le « film de conditionnement » (Costerton et Lappin-Scott, 1989). Comment la bactérie sait-elle qu'un support est à proximité ? Il est connu que les bactéries libèrent des protons et des molécules signal dans leur environnement. Ces messagers sont supposés diffuser de façon radiale. On suppose que lorsqu'une bactérie est proche d'une surface, elle détecte une augmentation locale de la concentration en messagers (Costerton, 1999).

III-2-2- Phase 2 : Adhérence et site d'initiation

En 1964, Mitchell et Marshall examinent les premières étapes de la formation du biofilm à partir d'une culture pure et distinguent l'adsorption réversible de l'adhésion définitive qui constitue la première étape de la maturation du biofilm (Costerton, 1999).

L'adsorption implique des forces faibles. Ces forces agissent sur les bactéries qui sont considérées comme des particules colloïdales afin de pouvoir appliquer la théorie **DLVO** (**D**erjaguin **L**andau **V**erwey **O**verbeek). Selon la théorie dite D.L.V.O.1, l'attachement réversible de la bactérie sur la surface, ou « adsorption », dépend des forces d'attraction ou de répulsion existant entre la couche ionique autour de la bactérie et la charge de la surface. Autrement dit, si une surface est chargée positivement et qu'une bactérie l'est négativement, les deux s'attireront aussi facilement. En plus du D.L.V.O., il faut tenir compte. Ainsi, la somme des forces attractives de Van Der Waals et London (agissant de 10 à 50 nm) et des forces

répulsives électrostatiques (agissant de 10 à 20 nm) définit l'interaction totale entre la bactérie et la surface séparées par une distance D . Entre 10 et 20 nm, la bactérie et le support, généralement chargée négativement, se repoussent (Roques, 2000). La concentration en électrolyte est alors importante car la formation d'une couche cationique peut permettre le rapprochement des deux partenaires.

En plus de ces forces il faut tenir compte de nombreux facteurs comme la tension de surface du système en cause (modulée par la présence ou l'absence de savon ou d'autres agents tensio-actifs), la déformation des cellules bactériennes, ou encore la répartition non uniforme des charges électriques.

La micro-colonie naissante se déplace ensuite sur la surface grâce à un mouvement appelé « twitching ». Ce déplacement saccadé mobilise des structures membranaires nommées fimbriae ou pili de type IV (Semmler et al., 1999). Le twitching est 100 fois plus lent que la nage impliquant le flagelle. Le but de ce mouvement de masse est de trouver un site idéal de colonisation. Les caractéristiques d'un tel site sont actuellement totalement inconnues. Une fois ce site atteint, la colonisation peut commencer. Des forces physiques et chimiques vont ensuite se combiner pour sceller définitivement la cellule à la surface (Costerton et Lappin-Scott, 1989).

Lors de l'adhésion, la bactérie acquiert de nouvelles structures (flagelles latéraux, fimbriae, adhésines, exopolymères) et modifie son phénotype en réponse au contact avec la surface. Les bactéries vont s'ancrer au support par l'intermédiaire d'appendices cellulaires, les pili. Chez *Klebsiella pneumoniae*, les pili de type III ont un rôle important dans la colonisation des surfaces (Di Martino *et al.*; 2003). Les adhésines (pili de type I) chez *E. coli* sont sensibles au mannose (Stickler, 1999). Chez *P. aeruginosa*, les fimbriae sont très importants (O'Toole *et al.*, 2000); des mutants déficients en pili de type IV sont incapables de se fixer sur un support et d'initier la formation de micro-colonies. De tels mutants de *P. fluorescens*, ayant perdu toute aptitude à coloniser les surfaces, retrouvent leur aptitude à former un biofilm s'ils sont plongés dans un milieu riche en citrate, en glutamate ou en fer (O'Toole *et al.*, 2000). Ces pili de type IV joueraient un rôle dans l'accumulation cellulaire au sein de la micro-colonie naissante (Stickler, 1999). Les fimbriae sont impliqués dans une liaison spécifique avec un support (comme les supports biotiques)

contrairement aux ExoPolySaccharides (EPS) qui engendrent une liaison non spécifique (Costerton, 1999). Ces nouvelles structures macromoléculaires sont à l'origine de nouvelles interactions entre la bactérie et le support comme des liaisons chimiques (électrostatiques, covalentes, hydrogène), des interactions dipôles (dipôle – dipôle, dipôle – dipôle induit, ion – dipôle) et des interactions hydrophobes. C'est durant cette étape d'adhésion que la physiologie bactérienne s'oriente vers un phénotype « biofilm ». Ainsi, c'est lors de l'adhésion que *P. aeruginosa* surexprime *algC* et *algD*, deux gènes impliqués dans la production d'alginate.

III-2-3 - Phase 3 : Maturation du biofilm

Différents facteurs physiques, chimiques et biologiques vont conditionner la formation du biofilm. Certains de ces différents paramètres sont regroupés dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Facteurs impliqués dans la formation des biofilms (Wimpenny et al., 2000).

Facteurs	Implication(s)
Facteurs génétiques	Génotype spécifique de l'organisme Expression de gènes liés aux propriétés des surfaces Expression de système signal Production d'EPS Taux de croissance, affinité pour les substrats Expression de facteurs génétiques non directement liés à la formation de biofilm (mobilité, chimiotactisme)
Facteurs physico-chimiques	Composition de la surface et rugosité Nature du substrat Concentration et gradient du substrat Température, pH, potentiel hydrique, pression, oxygène disponible, radiation
Processus stochastiques	Colonisation initiale : attachement et détachement Modifications aléatoires des facteurs biotiques et abiotiques
Phénomènes déterministes	Interactions spécifiques entre les organismes : compétition, neutralité, coopération et prédation
Processus mécaniques	Forces de cisaillement

Import / export	Ajout ou perte de composants biotiques ou abiotiques au biofilm
Changements temporeux	Alternance jour/nuit qui modifie l'environnement (lumière, température, pH, P _{O2})

La première étape de la maturation correspond à la dernière étape de la colonisation, c'est-à-dire à la production d'exopolysaccharides dont la nature varie avec l'espèce bactérienne. Ces EPS sont capables de concentrer les métaux et les acides organiques (Costerton et Lappin-Scott, 1989). L'alginate, un polymère d'acides mannuronique et guluronique, est l'EPS majoritairement retrouvé dans les biofilms de *P. aeruginosa*. La matrice est en fait un mélange complexe de macromolécules constitué outre les EPS, de protéines et d'ADN (Sutherland, 2001). Cet ADN extracellulaire a longtemps été supposé être le résultat de la lyse cellulaire et donc ne jouer aucun rôle dans la vie du biofilm. Aujourd'hui, il a été montré que certaines bactéries, dont *P. aeruginosa*, sécrètent de petites quantités d'ADN extracellulaire via de petites vésicules (Kadurugamuwa, 1995). Whitchurch a démontré que l'addition de DNase I dans le milieu de culture inhibe fortement la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* et dissout les biofilms âgés de moins de 60 heures (Whitchurch *et al.*, 2002). Par la formation de la matrice, le biofilm va acquérir son architecture dite en champignon (Costerton *et al.*, 1995)

Un cycle de croissance et de relargage cellulaire s'établit par la suite. C'est ce cycle qui fait des biofilms de véritables réservoirs de pathogènes. Le relargage des bactéries étant induit par la carence ; il a été avancé qu'il devait permettre aux bactéries de retrouver un milieu plus favorable (O'Toole *et al.*, 2000). Les protagonistes principaux impliqués dans cette libération cellulaire sont les forces de cisaillement, les modifications de l'énergie de surface, la croissance bactérienne et la dégradation enzymatique des structures adhésives.

Le biofilm doit ainsi être vu comme un véritable système multicellulaire qui va au-delà de la compartimentation actuelle que l'on en a fait (Stewart, 2001). Cette transition de l'état de cellules individuelles en suspension à l'état de membres d'une communauté complexe, entraîne inévitablement de profonds changements chez les micro-organismes.

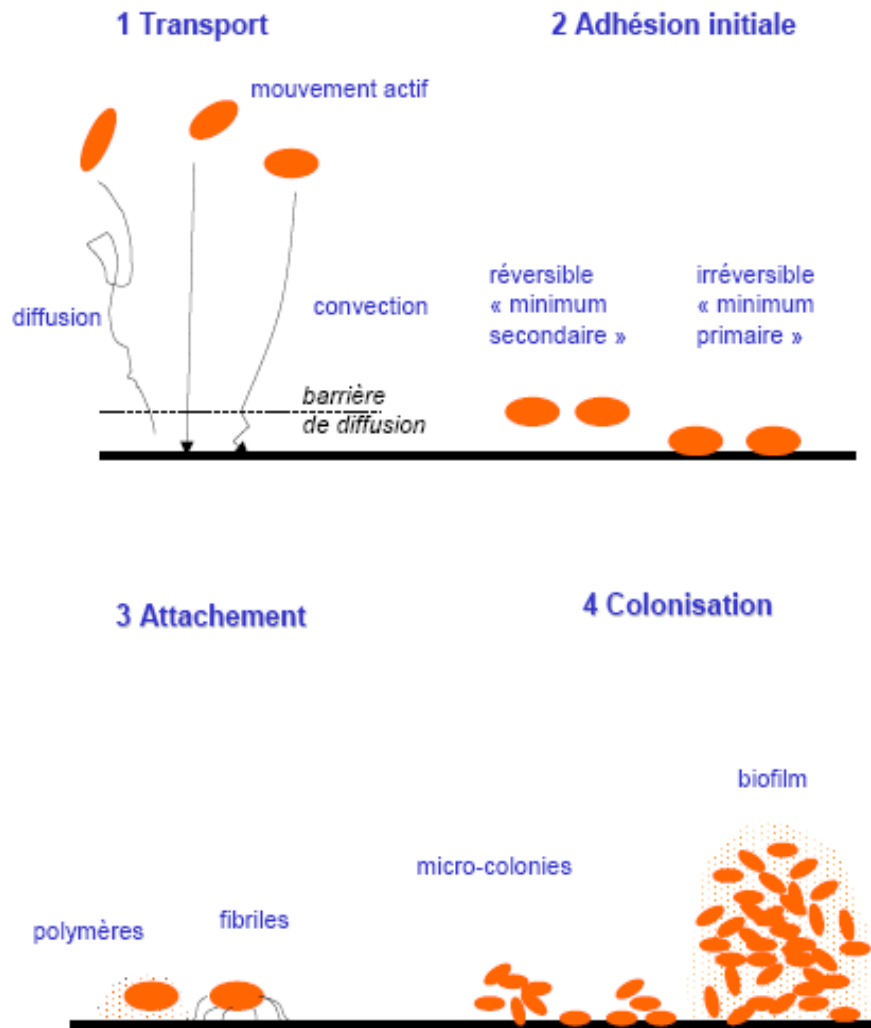


Figure 11: Représentation des étapes de colonisation des surfaces par des microorganismes (Van Loosdrecht *et al.*, 1990)

III-2-4- Phase 4 : Le détachement

Ce détachement de cellules du biofilm est conditionné par le milieu environnant. La carence nutritionnelle est le facteur déclencheur du phénomène poussant les bactéries à trouver un milieu plus favorable (O'Toole *et al.*, 2000). Le détachement de cellules est considéré comme un événement lié à divers stress dont les signaux peuvent être portés par le liquide traversant le biofilm (Picioreanu *et al.*,

2001). Les mouvements du liquide et les forces de cisaillements, la multiplication cellulaire (Allison *et al.*, 1990) et une dégradation enzymatique (Vats and Lee, 2000), semblent contribuer très favorablement à la dispersion des bactéries. Cette dispersion se fait soit de manière individuelle, soit de façon plus générale par détachement d'un groupe de cellules.

Chez *P. aeruginosa*, non seulement l'augmentation de la disponibilité et du type de sources carbonées augmente le phénomène de dispersion, mais l'alcalinisation du milieu (de 3 à 10,2) semble également favoriser ce phénomène (Sauer *et al.*, 2004). Une concentration de 20 mM en succinate est capable de réduire de près de 80% la biomasse d'un biofilm âgé de 4 jours. Les auteurs ont pu mettre en évidence que ce phénomène de dispersion est étroitement associé à une production des flagelles (codés par le gène *fliC*) peu de temps après l'induction de la dispersion. La présence de ces flagelles est caractéristique des cellules planctoniques. Dans le même temps, la sous-expression des pili se fait de manière progressive et se maintient chez les cellules constituant le biofilm et chez les cellules relarguées.

Le retour vers l'état planctonique des cellules détachées d'un biofilm est un processus dynamique et régulé. Chez des souches de *P. aeruginosa* qui possèdent naturellement une capacité de détachement exacerbée. La mobilité des variants et de la souche sauvage est inchangée sauf au niveau du swarming qui est facilité par les rhamnolipides. L'utilisation d'une protéine de fusion entre RhlA (protéine impliquée dans la biosynthèse des rhamnolipides) et de la GFP (green fluorescent protein) a permis d'estimer le taux de production de rhamnolipides. L'expression de RhlA est jusqu'à cinq fois supérieure chez les variants cultivés en biofilm par rapport à la souche sauvage. Un mutant n'exprimant plus les gènes *rhlAB* présente une diminution dans sa capacité de détachement et forme un biofilm tridimensionnellement structuré se rapprochant de celui formé par la souche sauvage. L'induction de *rhlAB* chez la souche sauvage conduit à une production plus importante de rhamnolipides.

Les biofilms sont donc des entités pluricellulaires complexes et dynamiques. Le passage de l'état planctonique vers cet état adhérent et coopératif va induire chez les bactéries un grand nombre de modifications physiologiques.

IV- Influence des propriétés de surface sur la formation du biofilm

L'adhésion d'un microorganisme sur une surface solide est un processus complexe qui implique deux surfaces dont l'une au moins est de nature biologique. La diversité des acteurs impliqués et les différents types d'interactions matériau/surface microbienne, qu'elles soient spécifiques ou non spécifiques, compliquent encore l'analyse et l'interprétation des données.

Mais il faut garder à l'esprit que les interactions spécifiques et non spécifiques résultent des mêmes interactions physico-chimiques fondamentales. Dans le cas des interactions spécifiques, seules les forces entre des groupements très localisés à la surface des corps en présence sont prises en compte. Au contraire, pour les interactions non spécifiques, on s'intéresse aux forces intégrées sur l'entière surface des corps.

Le recours aux deux approches complémentaires, physico-chimie et biologie, est essentiel pour cerner les différents aspects du problème et mieux appréhender l'ensemble des mécanismes qui ont lieu aux interfaces. Le présent chapitre va s'intéresser à l'étude de l'adhésion d'un point de vue purement physico-chimique.

Dans l'approche physico-chimique « pure », on ne dissocie pas le vivant des autres matériaux.

Les cellules sont identifiées comme des particules colloïdales idéales, sphériques et rigides, avec une surface parfaitement définie et uniforme. Les modèles les plus simples ne prennent en compte que les interactions non spécifiques. A noter toutefois que les évolutions actuelles ont tendance à considérer les spécificités des microorganismes (présence de flagelles, pili, macromolécules adsorbées).

Selon l'approche physico-chimique, le processus d'adhésion est le résultat des interactions intermoléculaires s'établissant entre les surfaces du microorganisme et du support :

- les interactions de type électrostatique ;
- les interactions liées aux forces de van der Waals ;
- et enfin les interactions polaires (hydrophiles/hydrophobes).

De façon à comprendre l'adhésion d'un microorganisme sur une surface, il est nécessaire de prendre en compte ces différents types d'interactions ainsi que leur évolution en fonction de la distance de séparation des corps considérés.

La physico-chimie des surfaces fournit trois approches permettant de prédire l'adhésion d'un microorganisme sur une surface solide :

- La théorie de la stabilité de l'état colloïdal, encore appelée théorie DLVO formulée par Derjaguin et Landau (1941), et Verwey et Over Beek (1948)

- la théorie du mouillage donnée par la thermodynamique des surfaces

- la théorie DLVO étendue par van Oss et ses collaborateurs (van Oss et al. 1986).

Après un rappel sur les forces intermoléculaires, nous présenterons les principes et les éventuelles limitations de ces trois modèles théoriques.

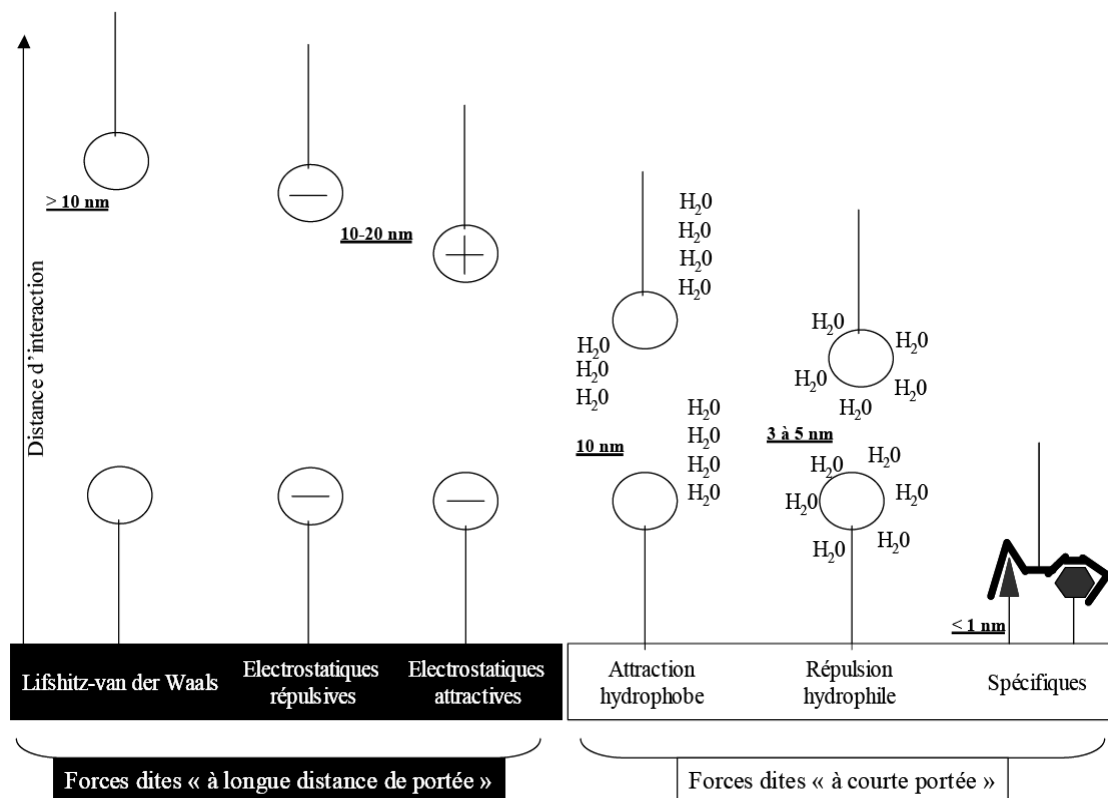


Figure IV-1 : Schéma descriptif des interactions pouvant s'établir entre deux corps et distances pour lesquelles ces interactions sont significatives.

IV- 1- Rugosité

En tête de liste des conditions favorisant la génération d'un biofilm dans l'industrie se trouve le type de surface avec laquelle la bactérie est mise en contact. Les bactéries affectionnent particulièrement les surfaces poreuses, comme le bois ou la céramique, à cause de leurs micro-cavités hospitalières.

La rugosité du support est certainement le paramètre le plus discuté dans la littérature. Selon certains auteurs, la présence de « microcrevasses » peut favoriser l'adhésion en protégeant les microorganismes des phénomènes de cisaillement hydrodynamique. Pour d'autres, en revanche, la rugosité permet de réduire la surface de contact entre le microorganisme et le support, favorisant ainsi son détachement (Boulangé-Petermann et al., 1997). Mais les espèces étudiées, les supports et les méthodes d'évaluation de l'adhésion étant variés, il est difficile d'édicter des règles.

Si on tente d'établir une certaine hiérarchie, on classera, en ordre croissant de porosité, le verre, l'acier inoxydable, l'aluminium, le caoutchouc et les matières plastiques. Un examen au microscope électronique à balayage révèle qu'une surface en acier inoxydable retient une faible population d'*Escherichia coli*, comparativement à une surface de plastique, qui en retient davantage.

La présence de « coudes » dans la tuyauterie et de jonctions de toutes sortes sur la surface favorise également l'accumulation de résidus et de bactéries. Même dans une ligne de production droite, une surface fendillée, craquelée ou crevassée par l'usure héberge plus de bactéries qu'une surface lisse et neuve. Vue au microscope, la surface d'une vieille planche à découper en plastique présente de véritables « canyons » dans lesquels les microorganismes peuvent mener une existence paisible.

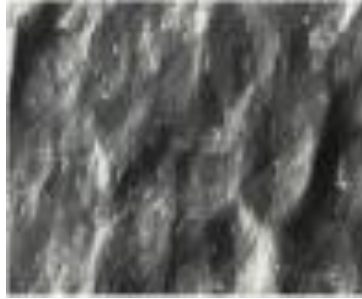


Figure A



Figure B

Figure IV-2 : En comparant la microstructure de surfaces neuves de plastique (a) et de verre (b), on remarque que les accidents de surface, plus fréquents sur le plastique, sont autant d'alcôves dans lesquels les bactéries se nichent et se reproduisent.

Mafu Akier Assanta;

IV- 2- Hydrophobicité

Si la porosité joue un rôle clé, la mouillabilité de la surface (propriété qui permet aux liquides de s'étaler plutôt que de perler) semble aussi revêtir une importance primordiale. En effet, les matériaux hydrophobes, peu chargés (téflon, polyéthylène, polystyrène, etc.) fixeraient plus facilement les bactéries que ceux de nature hydrophile, comme le verre, peu importe leur charge.



Figure A



Figure B

Figure IV-3 : Certaines surfaces sont plus «attachantes» que d'autres pour les pathogènes : après 24 heures de contact à 20°C, la bactérie *Escherichia coli* se fixe beaucoup plus au plastique (A) qu'à l'acier inoxydable (B).

Pour Van Oss (1996), l'ensemble des interactions polaires (interaction hydrophobes) est la composante majoritaire de l'ELS. En effet, lors de ses travaux en 1996, il démontre que les interactions hydrophobes peuvent être jusqu'à 100 fois supérieures aux interactions de Van der Waals et aux interactions électrostatiques. Il est donc possible d'établir une corrélation entre l'ELS et l'hydrophobicité. Lorsque l'ELS diminue, l'hydrophobicité augmente, et inversement (Weerkamp et al., 1988). Une fois établie, cela a suscité beaucoup d'intérêt pour de nombreux auteurs, pour prédire l'adhésion bactérienne (van Loosdrecht et al., 1987 ; Satou et al., 1988 ; Yoshida et al., 1998 ; Radford et al., 1999).

L'hydrophobicité d'une bactérie est due en grande partie à la présence des composés de surface de la bactérie, utiles à l'adhésion (Rosenberg et al., 1990).

Il est alors aisé de comprendre qu'une bactérie hydrophobe aura plus de facilité pour enlever le film d'eau la séparant de la surface à coloniser et qu'elle établira plus facilement contact avec cette surface, qu'une bactérie hydrophile.

Pour évaluer l'hydrophobicité d'une surface, deux techniques sont été utilisées : la mesure d'angle de contact et la mesure d'adhésion aux solvants.

- La mesure de l'angle de contact entre une goutte d'eau et la surface à étudier permet une évaluation directe des propriétés hydrophobes / hydrophiles de la surface (Rosenberg et al., 1990). La surface est dite hydrophobe quand l'angle est supérieur à 50° et hydrophile quand l'angle est inférieur à 50°.

- La méthode d'adhésion aux solvants (MATS) dérive d'une première méthode mise au point par Rosenberg et al. (1980) qui utilisait l'adhésion à l'hexadécane uniquement. Bellon- Fontaine et al. (1996) et Lee et Yii (1996) ont développé cette technique avec l'étude de trois solvants hexadécane (solvant apolaire), éther (solvant polaire basique, donneur d'électrons) et chloroforme (solvant polaire acide, accepteur d'électrons).

La méthode MATS consiste à mettre en contact une suspension bactérienne de densité optique (DO) connue avec un solvant. Après une brusque agitation, des micro-gouttelettes de solvants se forment sur lesquelles les bactéries adhèrent, ou non, selon l'hydrophobicité.

Il suffit de mesurer la DO de la phase aqueuse et de déterminer le pourcentage d'adhésion au solvant, à l'aide de ce rapport :

$$\frac{\text{DO (phase aqueuse de départ)} - \text{DO (phase aqueuse après mélange)}}{\text{DO (phase aqueuse de départ)}}$$

D'après les études de Lee et Yii (1996), il est permis de dire qu'une bactérie est hydrophobe quand ce pourcentage est supérieur à 50%, hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 20% et moyennement hydrophobe quand le pourcentage est entre ces deux valeurs.

Les solvants utilisés ayant pratiquement la même composante Lifshitz van der Waals, et en absence d'interactions électrostatiques, les différences d'adhésion bactérienne observées entre les solvants monopolaires et le solvant apolaire peuvent être attribuées aux interactions acide – base. En effet, l'utilisation d'un tampon PBS de forte molarité (0,15M) permet de négliger les interactions de courte distance. Lorsque la distance bactérie – substrat est proche du nanomètre, les bactéries franchissent la barrière énergétique (maximum énergétique) et sont soumises à des interactions de courte distance, qui sont irréversibles :

- Les interactions acide – base (accepteur / donneur d'électrons), qui permettent la formation de liaisons hydrogènes (interactions de Lewis). Ce sont des interactions électrostatiques fortes, de courte distance, possibles lorsqu'un atome d'hydrogène est en contact avec un atome chargé négativement.
- Les interactions électrostatiques, qui se caractérisent par la formation de ponts entre une charge négative de la bactérie et une charge négative du substratum, grâce à des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}).
- Les interactions hydrophobes. Elles entrent en jeu lors d'une adhésion en milieu aqueux. Les molécules d'eau se disposent en structure ordonnée, assimilées à des molécules apolaires, pouvant ainsi former des liaisons avec d'autres molécules apolaires.
- Les interactions de van der Waals sont toujours présentes et des interactions répulsives d'hydratation (phospholipides – surfaces solides) et des liaisons covalentes peuvent également être observées.

IV- 3- Charge de la surface

Enfin, la force d'attachement dépendra aussi de la charge de la surface et de la durée du contact.

En outre, la présence de certaines molécules organiques ou de certains ions dans le milieu d'immersion peut modifier considérablement les propriétés d'adhésion. Ainsi, dans la plupart des cas, les ions monovalents (Na^+ et K^+), bivalents (Ca^{++} , Mg^{++}) ou trivalents (Al^{+++}) augmentent les chances de voir une bactérie adhérer à la surface, alors que l'absence de ces éléments peut empêcher l'adhésion de se produire, voire entraîner le détachement de la cellule bactérienne. D'où la nécessité d'explorer ce champ de recherche pour assurer la salubrité des surfaces.

Les chercheurs font de plus en plus d'efforts pour trouver des matériaux dont les propriétés seraient défavorables à l'adhésion des bactéries, par exemple, un matériau aux propriétés autonettoyantes où les forces d'attraction seraient insuffisantes pour maintenir le contact avec la bactérie. Le choix d'un tel matériau n'est pas aisé, Plusieurs chercheurs consacrent donc leurs efforts à greffer des agents chimiques (ions) qui rendraient difficile l'attachement bactérien. (Derjagouin - Landau - Verwey – Overbeek).

IV- 4 - Forces d'interactions

La figure VI-I présente une représentation schématique des différentes interactions possibles entre un microorganisme et une surface solide et les distances pour lesquelles ces forces sont significatives.

A-Interactions électrostatiques

Dès que les corps sont plongés dans un milieu aqueux, des forces électrostatiques apparaissent, sous l'effet de charges électriques surfaciques, liées à deux phénomènes principaux (Israelachvili, 1992) :

(i) l'ionisation ou la dissociation des groupements fonctionnels de surface ; par exemple, la dissociation d'un proton à partir des groupements SiOH à la surface du verre, (i.e. $\text{SiOH} \rightarrow \text{SiO}^- + \text{H}^+$), produit une charge de surface négative ;

(ii) l'adsorption d'ions (cations ou anions) contenus dans la solution aqueuse.

Quel que soit le mécanisme conduisant à l'apparition des charges de surface, ces dernières confèrent à la surface un potentiel de surface Ψ_0 . La présence de ces charges de surface influence la distribution spatiale des ions contenus dans la solution.

Les ions de charge opposée (contre-ions) sont attirés par la surface, et ceux de charge identique (co-ions) sont repoussés loin de l'interface. Cet excès de contre-ions est maximal à la surface puis diminue progressivement lorsque l'on s'éloigne de cette surface et ce, jusqu'à ce que l'équilibre ionique de la phase aqueuse soit retrouvé.

Cet excès de contre-ions forme ce que l'on appelle la double couche ionique. Elle est constituée (figure IV- 4) :

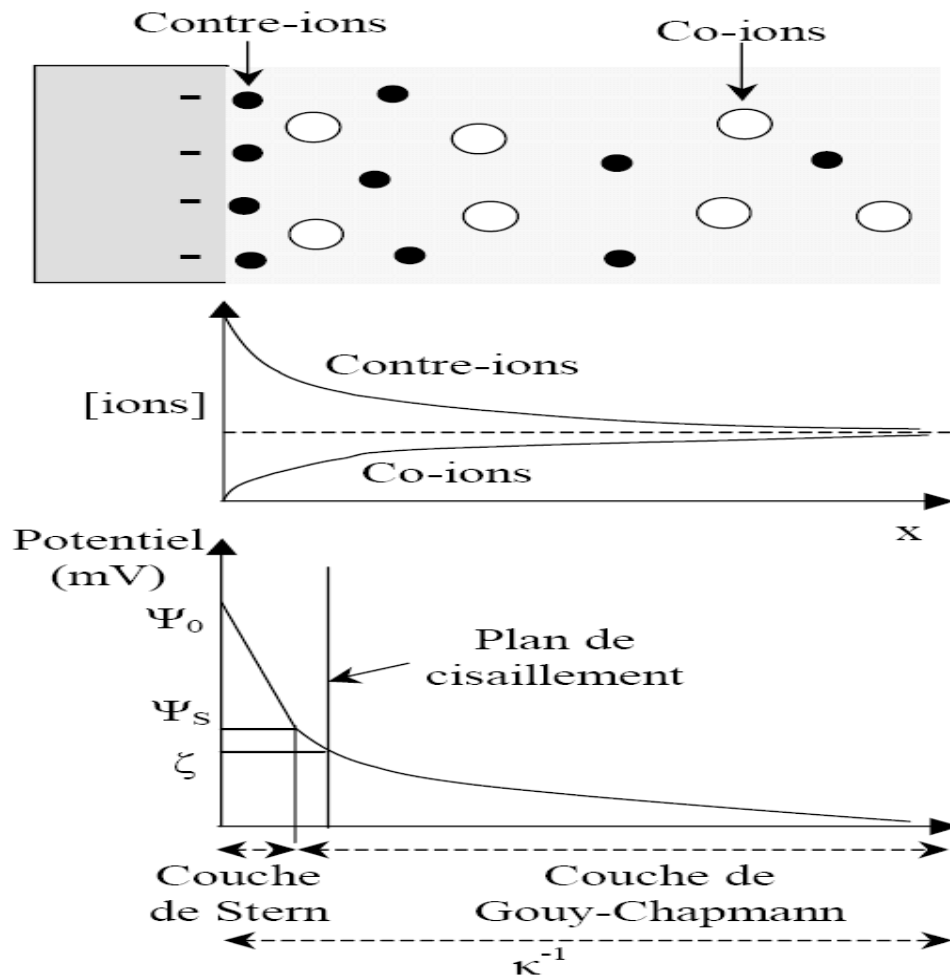


Figure IV-4 : Double couche électrique au voisinage d'une surface chargée

(i) d'une région interne, la couche de Stern, formée d'ions fortement adsorbés sur la surface : son épaisseur est environ égale au diamètre moyen des ions hydratés adsorbés ;

(ii) au-delà de cette couche, on trouve la couche diffuse de Gouy-Chapmann qui correspond à l'atténuation progressive de l'excès de contre-ions, jusqu'à ce que l'équilibre ionique de la phase aqueuse soit retrouvé.

Lorsque particule et surface solide s'approchent l'une de l'autre, il s'exerce une interaction électrostatique, liée au recouvrement de leurs doubles couches respectives. Cette interaction est répulsive si les deux surfaces portent des groupements chargés de même signe et attractive dans le cas contraire. L'épaisseur de la double couche, κ^{-1} , est inversement proportionnelle à la force ionique du milieu (concentration en ions de la phase aqueuse et valence de ces ions).

Le pH du milieu, par son influence sur le nombre de groupements dissociés présents en surface, intervient également dans l'intensité des forces d'interaction électrostatiques.

Du fait de l'adsorption de contre-ions sur la surface chargée, le potentiel de surface Ψ_0 chute jusqu'à Ψ_S dans la couche de Stern (figure IV). Dans la couche diffuse, ce potentiel décroît plus lentement jusqu'à devenir nul. Si l'on provoque un mouvement relatif de la phase aqueuse par rapport à la surface, il apparaît un plan de cisaillement, situé dans la couche diffuse, au voisinage de la couche de Stern. On appelle potentiel zêta ζ le potentiel au plan de cisaillement. Il est inférieur à Ψ_S et n'est pas équivalent au potentiel de surface Ψ_0 (James, 1979).

Le potentiel zêta peut être déterminé par des méthodes électrocinétiques, comme la mesure de la mobilité électrophorétique ou du potentiel d'écoulement.

B-Interactions non électrostatiques

1) Interactions apolaires liées aux forces de van der Waals

Les forces de van der Waals sont des forces d'attraction ou de répulsion entre deux ou plusieurs molécules. Elles sont universelles et interviennent quels que soient

les corps considérés. Celles-ci se distinguent des liaisons chimiques par le fait qu'elles ne sont pas assez fortes pour donner lieu à des structures géométriques définies ; elles ne donnent lieu qu'à des édifices de dimensions variables, qui se font et se défont en permanence.

Les forces de van der Waals résultent des interactions électriques entre molécules globalement neutres. Elles sont dues à l'interaction des électrons d'une molécule avec les noyaux des molécules voisines. Elles résultent de trois effets physiques différents.

a) Interaction de Keesom entre dipôles

Il s'agit d'une attraction entre deux molécules polaires, c'est-à-dire d'une interaction dipôle dipôle (Keesom, 1921). Le champ d'un dipôle tend à orienter les autres. Cet effet d'orientation se traduit par l'existence d'une énergie potentielle entre molécules.

b) Interaction de Debye entre dipôle et dipôle induit

Une molécule non polaire, placée dans un champ électrique créé par une molécule polaire, se polarise et acquiert un moment dipolaire induit (Debye, 1920). Ce moment dipolaire est proportionnel d'une part au champ électrique créé par la molécule polaire, et d'autre part à une grandeur caractéristique de la molécule non polaire, sa « polarisabilité ». La « polarisabilité » d'une molécule croît avec les dimensions de celle-ci.

c) Interaction de London (ou de dispersion) entre dipôles induits

Même en l'absence de molécules polaires, il subsiste des interactions moléculaires très faibles appelées forces de London. Par suite des fluctuations de la position de ses électrons, la configuration électronique d'une molécule change continuellement. Une molécule quelconque présente donc, à certains instants, un moment dipolaire instantané, capable de créer un champ électrique et faire apparaître des dipôles induits en phase dans les molécules voisines (London, 1930).

Les forces de Keesom et Debye sont négligeables en milieu aqueux et seules les forces de London subsistent. Ces dernières sont communément nommées forces de Lifshitz-van derWaals.

2) Interactions polaires

Les interactions polaires sont des interactions que l'on trouve en milieu aqueux et qui sont liées à la capacité de l'eau à former des liaisons hydrogène.

a) Liaison hydrogène

A proximité des surfaces solides, les molécules d'eau s'organisent en une structure quasicristalline.

Il en résulte la création de liaisons hydrogène entre :

- (i) les atomes électronégatifs des surfaces (O, Cl, F, N) et les atomes d'hydrogène de la molécule d'eau ;
- (ii) ou entre les atomes d'hydrogène des surfaces et l'atome d'oxygène de la molécule d'eau.

Un composé donné (molécule, macromolécule, particule, surface,...) peut être hydrophile, c'est-à-dire capable d'intervenir dans des liaisons hydrogène, ou hydrophobe, c'est-à-dire incapable d'intervenir dans les liaisons hydrogène. Il existe différents degrés dans ce caractère, qui se traduit par l'existence d'interactions hydrophiles et hydrophobes plus ou moins marquées.

b) Répulsion hydrophile

Dans le cas de surfaces polaires ou chargées, les groupements fonctionnels de la surface deviennent hydratés : ils s'associent avec les molécules d'eau par des liaisons hydrogène.

L'interaction entre deux surfaces hydratées est une interaction répulsive. En effet, l'affinité de chacune de ces surfaces pour l'eau se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau. Or, pour parvenir à un contact rapproché des deux surfaces, il est nécessaire que celles-ci libèrent les molécules d'eau associées en fournissant de l'énergie.

Il en résulte une énergie de répulsion hydrophile, ΔG^{AB} , positive. Cette répulsion hydrophile est fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation d . Elle varie avec d , selon une loi exponentielle et est effective à des distances de l'ordre de 3 à 5 nm.

Selon la théorie développée par van Oss (1996), dans le cas de particules hydrophiles, il est possible de distinguer celles qui ont des propriétés de surface acides (c'est-à-dire accepteurs d'électrons) ou basiques (donneurs d'électrons) au sens de Lewis. Une répulsion hydrophile aura lieu entre deux corps de « nature » identique au sens de Lewis.

c)Attraction hydrophobe

Dans le cas où une surface solide ne porte pas de groupements fonctionnels ioniques ou polaires, ni de sites adéquats pour la formation de liaisons hydrogène, cette surface est inerte vis-à-vis de l'eau et est donc hydrophobe. Les molécules d'eau se trouvant à proximité de cette surface ont tendance à s'en éloigner pour s'entourer d'autres molécules d'eau. Dans le cas où ces molécules sont confinées entre deux surfaces hydrophobes, leur mouvement moyen en direction de la solution aqueuse favorise le rapprochement des surfaces. L'énergie d'attraction hydrophobe qui en résulte, ΔG^{AB} , est négative. Cette attraction hydrophobe est également fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation d . Elle varie avec d selon une loi exponentielle et est effective à partir de distances de l'ordre de 10 nm.

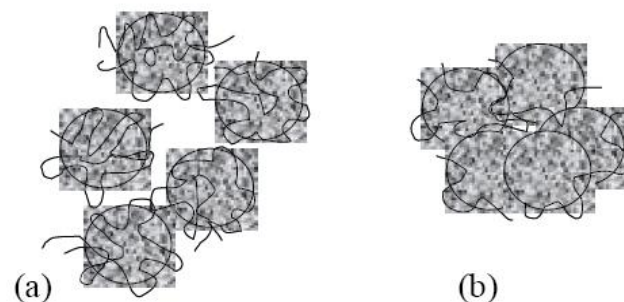


Figure IV-5 : Interactions stériques dues à la présence de chaînes de polymères adsorbées sur deux particules. (a) répulsion : la densité surfacique est élevée, la répulsion stérique est dominante. (b) attraction : la densité surfacique des polymères adsorbés est faible et les chaînes sont suffisamment longues pour s'adsorber simultanément sur plusieurs surfaces, générant ainsi une attraction par pontage.

3) Interactions stériques

Ces interactions interviennent dans le cas d'un milieu où des macromolécules sont présentes, ce qui se rapproche de la réalité biologique. La présence d'une couche adsorbée de polymères ou de tensioactifs sur les surfaces considérées peut influencer l'ensemble des interactions précédemment décrites (Elimelech et al., 1995) en modifiant leur charge de surface ou leur affinité vis-à-vis de l'eau par exemple.

En outre, l'adsorption de ces macromolécules sur les surfaces peut conduire à un encombrement stérique qui empêche les objets de se rapprocher trop près les uns des autres (figure IV-5 (a)).

Le potentiel d'interaction qui en résulte dépend à la fois de la densité des macromolécules adsorbées et de la longueur des chaînes. L'interaction qui en résulte est a priori répulsive (figure IV (a)) mais peut devenir attractive par accrochage des polymères sur les deux objets (figure IV (b)). On parle alors de pontage.

IV- 5- Les théories

Il existe à l'origine deux approches, initialement considérées comme distinctes, de l'adhésion des microorganismes aux surfaces :

- la théorie DLVO prend en compte les interactions électrostatiques ainsi que les interactions de Lifshitz-van der Waals ;
- l'approche thermodynamique ne prend en compte que les interactions non électrostatiques.

Ces deux théories ont été réconciliées par van Oss et ses collaborateurs (van Oss et al., 1986) au sein de la théorie DLVO étendue qui prend en compte les trois types d'interaction fondamentales (Lifshitz-van der Waals, acide-base de Lewis et électrostatiques) .

A-La théorie DLVO appliquée à l'étude de l'adhésion des microorganismes

La théorie DLVO, première théorie concernant la stabilité de l'état colloïdal, doit son nom aux auteurs qui l'ont développée indépendamment : Derjaguin et Landau (1941), et Verwey et Overbeek (1948).

Selon ces auteurs, une particule qui s'approche à une certaine distance d'une surface donnée va interagir avec cette surface par des forces de type van der Waals ou électrostatiques. Cette théorie est très largement utilisée pour rendre compte des phénomènes de floculation, d'agglomération ou de coagulation des systèmes colloïdaux. Elle permet donc de prévoir la probabilité qu'a la particule de se situer à une certaine distance de la surface considérée.

Il est possible de distinguer deux types d'adhésion :

- l'adhésion de minimum secondaire, c'est-à-dire une adhésion réversible qui laisse à la particule un mouvement brownien dans un plan ;
- l'adhésion de minimum primaire, irréversible. Dans ce cas, il n'y a plus aucun degré de liberté.

Cette théorie fournit une bonne description du comportement de particules colloïdales mais ne prend pas en compte les interactions intermoléculaires à courte portée. En effet, à des distances aussi faibles, d'autres types d'interactions telles que les liaisons hydrogène sont prépondérantes et déterminent la force d'adhésion au niveau du minimum primaire que la théorie DLVO ne prévoit pas.

Cette théorie peut toutefois être appliquée pour prévoir l'adhésion des microorganismes aux surfaces, sachant que les microorganismes sont loin d'être des particules idéales. Ils n'ont ni géométrie simple, ni composition moléculaire uniforme, et sont donc difficilement « modélisables ». On peut cependant les assimiler à des colloïdes lorsque leur taille est voisine de 1 μm . Pour des microorganismes de taille supérieure (par exemple les levures)

L'application de la théorie DLVO reste sujette à discussion. Cependant, en acceptant quelques approximations, les interactions entre microorganisme et surface solide peuvent être décrites par la théorie DLVO exposée ci-dessus (Marshall, 1985).

Selon cette théorie, l'adhésion microbienne est donc le résultat d'un équilibre s'établissant entre les forces de van der Waals et les forces électrostatiques. L'énergie libre d'interaction totale, ΔG^{TOT} entre le microorganisme et le support, séparés d'une distance d , est la somme des énergies libres liées aux interactions attractives de van der Waals, ΔG^{LW} , et aux interactions électrostatiques, ΔG^{EL} . Cette énergie est modulée par la force ionique du milieu et décroît avec la distance d de séparation entre les corps.

ΔG^{TOT} peut être calculée sur la base des expressions théoriques de ΔG^{LW} et ΔG^{EL} .

Ainsi, pour une particule sphérique immergée dans un solvant à proximité d'un support, les interactions de Lifshitz-van der Waals vont intervenir entre la surface de la particule et le solvant, entre la surface du support et le solvant et entre la surface de la particule et la surface du support, à la condition d'une distance particule/support suffisamment faible.

L'énergie d'interaction liée à ces forces de Lifshitz-van der Waals, notée ΔG^{LW} , entre une sphère de rayon a et une plaque semi-infinie, séparées d'une distance d s'écrit (Equation 1) :

$$\Delta G^{LW} = -\frac{A}{6} \left[\frac{a}{d} + \frac{a}{d+2a} + \ln\left(\frac{d}{d+2a}\right) \right] \quad \text{Equation 1}$$

avec A : constante de Hamaker (J)

a : rayon de la sphère (m)

d : distance entre la sphère et la plaque (m)

ΔG^{LW} est fonction de la nature de la particule, du solvant et du support, de leur géométrie et de la distance de séparation entre les corps. Elle est exprimée en mJ/m^2 .

Dans le cas de deux particules identiques en interaction, les forces de Lifshitz-van der Waals sont généralement attractives ($\Delta G^{LW} < 0$). Elles sont maximales au contact puis diminuent quand la distance entre les particules augmente. Elles restent effectives à des distances de l'ordre de 10 nm.

L'énergie d'interaction électrostatique, notée ΔG^{EL} et associée à ces interactions, est fonction de la charge portée par les particules, de leur géométrie, de leur distance de séparation d et de la force ionique du milieu. La force ionique du milieu a deux effets souvent couplés :

- une diminution du potentiel dans la couche de Stern, d'autant plus importante que la force ionique du milieu est forte et que la valence des ions est élevée ;
- une diminution de l'épaisseur de la double couche.

Les interactions électrostatiques diminuent donc fortement quand la force ionique du milieu augmente.

L'énergie libre d'interaction entre une sphère de rayon a (de potentiel zéta ζ_1) et une plaque semi-infinie (de potentiel zéta ζ_2), séparées d'une distance d , s'écrit (Equation 2) :

$$\Delta G^{EL} = \frac{\pi \varepsilon a (\zeta_1^2 + \zeta_2^2)}{1} \cdot \left[\frac{2 \zeta_1 \zeta_2}{\zeta_1^2 + \zeta_2^2} \ln \frac{1 + \exp(-\kappa d)}{1 - \exp(-\kappa d)} + \ln(1 - \exp(-2\kappa d)) \right] \quad \text{Equation 2}$$

$$\kappa = \sqrt{\frac{e^2}{\varepsilon B T} \cdot \sum_i z_i^2 n_i}$$

ε : permittivité du milieu (6,96.10-10 J.m-1.V-2 pour l'eau)

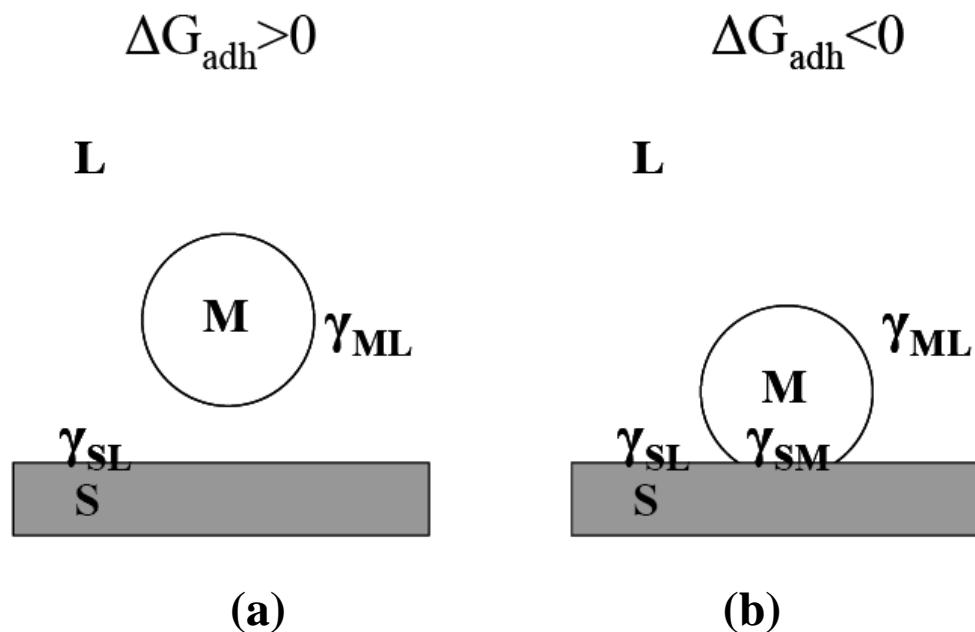
e : charge des électrons (1,6021.10-19 C)

B : constante de Boltzmann (1,3807.10-23 J.K-1)

T : température (K)

z_i : valence des ions

n_i : nombre d'ions par cm³



IV.6. Représentation schématique des énergies interfaciales mises en jeu lors de l'adhésion d'un microorganisme (M) en suspension dans un liquide (L) à un support (S). (a) pas d'adhésion (b) adhésion.

Bien que cette théorie constitue un outil intéressant pour étudier l'adhésion des microorganismes, notamment par la prise en compte des interactions à longue distance, elle a ses limites car il existe parfois des contradictions entre ce qu'elle

prévoit et les observations expérimentales. L'illustration (Dufrêne et al., 1996) prend uniquement en compte les interactions de Lifshitz-van der Waals et les interactions électrostatiques et néglige les interactions polaires. Cette théorie ne peut donc pas décrire le comportement d'un microorganisme à proximité immédiate d'une surface, notamment en milieu aqueux, où les interactions hydrophiles et hydrophobes sont susceptibles d'être très importantes.

B - La thermodynamique des surfaces : application à l'adhésion Microbienne

D'après certains auteurs, le phénomène d'adhésion microbienne peut être appréhendé sous un angle strictement thermodynamique (Busscher et al., 1984). Cette théorie, qui ne prend en compte que les interactions non électrostatiques (i.e. Lifshitzvan der Waals et acide-base de Lewis), est basée sur l'équation de Dupré (Dupré, 1869) appliquée à un système microorganisme-solide-liquide (milieu de suspension) comme illustré sur la figure IV-6 (a).

L'adhésion du microorganisme sur le support solide correspond à un état d'équilibre. Elle se traduit par la création d'une interface microorganisme-solide et, conjointement, par la destruction des interfaces microorganisme-liquide et solide-liquide (Absolom et al., 1983).

Cette variation peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\Delta G_{adh} = \Delta G_{MLS} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{SL} \quad \text{Equation 3}$$

où γ est l'énergie libre interfaciale, les indices S, M et L étant relatifs au support, au microorganisme et au milieu de suspension, respectivement.

Comme pour tous les systèmes présents dans la nature, le système présenté sur la (figure IV-6) va tendre vers un minimum d'énergie libre. En accord avec le second principe de la thermodynamique, l'adhésion microbienne est donc un processus favorisé, d'un point de vue énergétique, si la variation d'énergie libre $\Delta G_{adh} = \Delta G_{MLS}$ qui accompagne ce phénomène est négative ($\Delta G_{adh} < 0$) (figure

IV- 6 (b)). Au contraire, si ΔG_{adh} est positif, l'adhésion sera impossible (figure IV-6 (a)).

La variation d'énergie libre ΔG_{adh} accompagnant l'adhésion d'un microorganisme sur un support en milieu liquide peut être calculée à partir de la connaissance des énergies libres de surface du milieu de suspension, du solide et du microorganisme.

1) Calcul des énergies de surface des trois entités (microorganisme, support, milieu de suspension)

D'après van Oss et ses collaborateurs (van Oss et al., 1986), l'expression de l'énergie libre non électrostatique entre un solide (S) et un liquide (L) s'écrit :

- avec l'indice S désignant le solide et L le liquide,
- la composante polaire pouvant être décomposée en 2 termes non additifs : une composante donneur d'électrons γ^- et une composante accepteur d'électrons γ^+ .

D'après l'équation de Dupré, nous avons donc :

$$\Delta G_{SL}^{nonEL} = \Delta G_{SL}^{LW} + \Delta G_{SL}^{AB} \quad \text{Equation 4}$$

Avec:

$$\Delta G_{SL}^{LW} = - 2 \cdot \sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}}$$

$$\Delta G_{SL}^{AB} = - 2 \cdot \left(\sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+} \right)$$

- avec l'indice S désignant le solide et L le liquide,
- la composante polaire pouvant être décomposée en 2 termes non additifs : une composante donneur d'électrons γ^- et une composante accepteur d'électrons γ^+ .

D'après l'équation de Dupré, nous avons donc :

$$\Delta G_{SL} = \gamma_{SL} - \gamma_S - \gamma_L \quad \text{Equation 5}$$

Avec γ_L : tension superficielle du liquide

γ_S : énergie de surface du solide

γ_{SL} : énergie interfaciale solide – liquide

En introduisant ici l'équation de Young ($\gamma_{LV} \cdot \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} - \pi e$) et en négligeant la pression d'étalement (πe), comme préconisé par van Oss et al. (1986), nous avons :

$$\gamma_{SL} = \gamma_S - \gamma_L \cdot \cos \theta \quad \text{Equation 6}$$

En combinant cette équation aux équations 4 et 5, l'équation de Young-Dupré est obtenue (Equation 7), ce qui permet de déterminer les propriétés de surface du solide (γ_{S+} , γ_{S-} , $LW \gamma_S$),

à partir de la mesure d'angles de contact de ce solide avec des liquides dont on connaît les caractéristiques polaires (γ_{+L} ,) et apolaires ().

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \cdot \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \cdot \gamma_L^+} \right) \quad \text{Equation 7}$$

Le même type de raisonnement peut être appliqué au cas d'un microorganisme (M) pour lequel on recherche les composantes d'énergie de surface.

Dans le cas des liquides, la tension superficielle est accessible facilement de manière expérimentale : elle correspond à sa tension de vapeur (Bellon-Fontaine et Vernhet, 1999).

2) Calcul de ΔG_{adh}

Dans le cas d'un microorganisme (M) en présence d'une surface (S) dans un liquide (L), nous avons vu que l'équation de Dupré s'applique à un système à trois entités selon l'équation 3.

Il est alors possible d'exprimer l'interaction entre le microorganisme et la surface solide immergés dans un liquide, en tenant compte des interactions de Lifshitz-van der Waals et des interactions polaires (équation 8) :

Cette approche thermodynamique décrit une création d'interface mais, dans le cas d'une interaction cellule / matériau, le phénomène n'est pas aussi simple. Il est important de prendre en compte l'intervention de l'environnement cellulaire, ainsi que

les autres types d'interactions qui ont lieu. De plus, le phénomène est ici considéré comme totalement réversible, ce qui ne correspond pas au cas réel.

C-La théorie DLVO étendue

La théorie DLVO a été étendue par van Oss et al. (1986) afin de prendre en compte les interactions polaires. Cette théorie considère ainsi que les interactions de Lifshitz-van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions acide-base de Lewis sont les trois interactions fondamentales impliquées dans les phénomènes d'adhésion des microorganismes aux supports. Comme évoqué précédemment, les interactions acide-base sont dues aux caractères électron-donneur et électron-accepteur des espèces polaires en solution.

Selon ce modèle (van Oss et al., 1986), l'énergie libre d'interaction totale, ΔG_{TOT} entre deux corps, séparés d'une distance d , s'écrit donc (Equation 9).

$$\Delta G_{TOT} = \Delta G_{EL} + \Delta G_{nonEL} = \Delta G_{EL} + \Delta G_{LW} + \Delta G_{AB} \quad \text{Equation 9}$$

V- Acteurs moléculaires au sein des biofilms

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'adhésion et le fonctionnement des biofilms est encore loin d'être complète. Néanmoins, on sait que l'attachement est directement lié à la nature du support mais aussi à la présence d'appendices facilitant la fixation. Il est également influencé par la présence de protéines de la membrane externe et par la synthèse d'exopolysaccharides. (O'Toole and Kolter, 1998; Sauer *et al.*, 2002; Finelli *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2004; Waite *et al.*, 2005). De plus, pour un meilleur développement du biofilm et un meilleur contrôle de la population sessile, les bactéries communiquent entre elles via des molécules sécrétées (appelées autoinducteurs) dont les plus connues sont les homosérines lactones. Ces molécules vont influencer sur l'expression de gènes contrôlant la prolifération (Williams, 2006).

V- 1- Les facteurs de mobilité et d'adhérence

G.A. O'Toole et R. Kolter ont développé une méthode de criblage génétique qui a permis de caractériser un certain nombre de déterminants importants dans la formation de biofilm.

V- 1- 1- Le flagelle

Le flagelle est un appendice extracellulaire, permettant à la bactérie de se déplacer en milieu liquide ou semi-solide. G.A. O'Toole et R. Kolter ont confirmé, en utilisant la microscopie, qu'un mutant défectueux dans la formation du flagelle n'adhère que très faiblement au support.

En 2001, Vallet *et al.*, ont montré que non seulement la présence du flagelle mais, également, son fonctionnement normal est important pour l'attachement au support. En effet, des mutants, qui codent pour des éléments du moteur du flagelle mais dont l'inactivation n'empêche pas l'assemblage, sont incapables d'adhérer à un support. Ces observations indiquent que le flagelle est particulièrement important pour l'approche du support.

La première fonction du flagelle dans la formation du biofilm est le rapprochement de la bactérie planctonique vers le support (mécanisme de nage) et dans l'interaction initiale de la cellule avec la surface. L'absence de mobilité liée aux

flagelles chez des mutants de *P. aeruginosa* réduit considérablement l'adhésion de la bactérie sur le polystyrène (O'Toole and Kolter, 1998). Les mêmes constatations ont été obtenues chez *E. coli* et *Vibrio cholerae* (O'Toole and Kolter, 1998). Au sein du biofilm en formation, la bactérie réduit ensuite de manière importante la synthèse des flagelles. Ainsi, chez un biofilm de *P. aeruginosa* âgé de 24 heures, les gènes *flgD*, *flgE* et *fliD* sont réprimés (Whiteley *et al.*, 2001).

V- 1- 2- Les pili

Les pili de type IV sont des structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à Gram négatif, dont *P. aeruginosa*, et qui sont impliquées dans un type particulier de mobilité appelée twitching mobility (Wall *et al.*, 1999).

Ils permettent plus particulièrement des mouvements à l'interface de surfaces solides, mouvements fondés sur la capacité de rétraction de ces pili. La biosynthèse des pili de type IV fait intervenir plus d'une vingtaine de gènes, Contrairement aux mutants dépourvus d'un flagelle fonctionnel, les mutants dont la biogenèse des pili de type IV est affectée peuvent former une monocouche cellulaire sur un support, mais sont en revanche incapables de former les micro-colonies caractéristiques (O'Toole *et al.*, 1998).

Cette observation confirme que la formation des micro-colonies est bien un mécanisme d'agrégation cellulaire qui nécessite une mobilité, et non pas seulement une croissance clonale à partir d'une cellule bactérienne donnée.

Les pili jouent également un rôle dans la formation du biofilm. Des mutants des gènes impliqués dans la synthèse des pili montrent une incapacité à former des microcolonies sur polystyrène (O'Toole and Kolter, 1998). des mutants sur les gènes *cup* montrent notamment une capacité réduite à former des biofilms (Vallet *et al.*, 2001). Les pili sont responsables du mouvement appelé twitching qui est un déplacement de la microcolonie sur un support mais ils sont aussi impliqués dans l'adhésion des bactéries sur les cellules eucaryotes (Zolfaghar *et al.*, 2003). Ils interviennent dans les phases tardives de la formation du biofilm et tout particulièrement dans la formation de la structure en champignon (Chiang and Burrows, 2003). Les bactéries sont capables de migrer, grâce au twitching, vers le

sommet de la structure pour la faire évoluer (Klausen *et al.*, 2003). Ils possèdent également la capacité de se lier avec de l'ADN (van Schaik *et al.*, 2005). Enfin, il a été mis en évidence que les pili possèdent au niveau de leur terminaison C-terminale, un domaine récepteur qui agit comme médiateur de liaison avec les surfaces (Giltner *et al.*, 2006). Une mutation dans cette région conduit à une modification des propriétés de fixation de *P. aeruginosa* sur différents supports: l'adhésion sur un support constitué de fer diminue tandis que l'adhésion sur des cellules de l'épithélium buccal augmente par rapport à la souche sauvage.

V- 1- 3- Les fimbriae et les curli

Chez d'autres organismes, comme *Escherichia coli*, il a été montré que des appendices extracellulaires comme les fimbriae (Pratt *et al.*, 1998) ou les « curli » (Prigent-Combaret *et al.*, 2001) sont également importants lors de la formation du biofilm. En utilisant le type de criblage décrit par O'Toole et Kolter, mais en modifiant légèrement les conditions de croissance, Vallet *et al.*; 2001 ont pu identifier chez *P. aeruginosa* de nouveaux facteurs d'attachement.

En effet, des mutations dans les gènes appelés cupA (cup pour chaperone usher pathway) empêchent l'attachement au plastique. La voie chaperone usher pathway permet l'assemblage de pili de type fimbriae, qui sont essentiels à l'adhérence des *E. coli* uropathogènes (Sauer *et al.*, 2000). Ce type de système n'avait jusqu'alors pas été décrit chez *P. aeruginosa*.

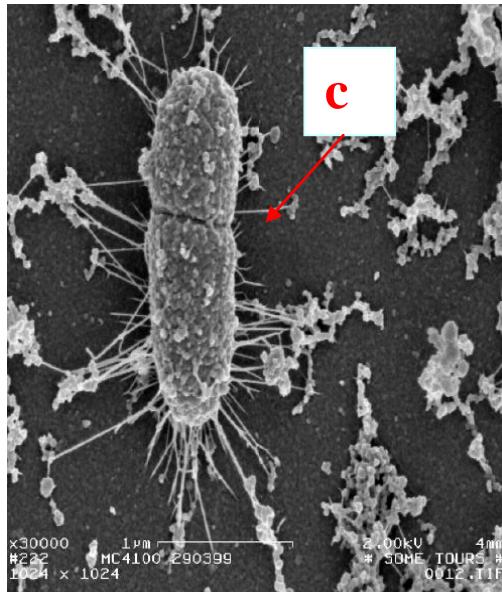


Figure V-1: Production des curli dans une Bactérie E.coli K12 en cours de division

[http:// www.biofilm-pnir.org](http://www.biofilm-pnir.org)

Le flagelle, les pili de type IV ou encore les Cup sont donc des appendices de surface, essentiels à la formation du biofilm, plus particulièrement dans sa phase initiale. On a vu en particulier comment le flagelle et les pili de type IV permettent l'approche et la colonisation de la surface. Dans l'étape suivante, ces structures ne sont probablement plus nécessaires et laissent la place à d'autres déterminants qui vont permettre la structuration et la différenciation en biofilm. Récemment, Peter Greenberg et ses collaborateurs ont réalisé une étude visant à déterminer la variation de l'expression des gènes chez des bactéries organisées en biofilm par rapport à des bactéries planctoniques grâce à l'utilisation de puces à ADN du génome de *P. aeruginosa*. Cette étude montre, entre autres, que l'expression des gènes codant pour PilA, la sous-unité structurale du pilus de type IV, FliC, la sous-unité structurale du flagelle, et CupA1, une sous-unité de type fimbriae, diminue en contexte biofilm. Cela confirme bien que ces structures ne sont pas nécessaires au maintien du biofilm, une fois le développement débuté.

V- 2- Les facteurs de différenciation

V-2-1- Le quorum sensing

Au cours de ces dernières années, un mode de régulation remarquable a été mis en évidence chez les bactéries, qui correspond à un mode de communication entre bactéries d'une même espèce. Ce système, dit quorum sensing, est considéré comme un mécanisme de régulation clé dans l'adaptation écologique et la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Ce système est fondé, chez les bactéries à Gram négatif, sur la production de phéromones diffusibles, des acyl-homosérine lactones (acyl-HSL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Les HSL produits par une bactérie donnée diffèrent par la longueur et les substitutions de leurs chaînes d'acides gras. Ces HSL sont synthétisés par une HSL-synthase qui est codée par un gène de type «I». Ces molécules diffusent à travers l'enveloppe cellulaire bactérienne et, lorsque leur concentration atteint un certain seuil, elles provoquent l'activation d'un régulateur transcriptionnel de type «R» qui va alors déclencher l'expression de gènes cibles. Le gène de type «I» est un de ces gènes cibles et les molécules d'HSL sont appelées auto-inducteurs. Plus la densité cellulaire est importante, plus leur concentration sera importante. A partir d'une certaine concentration en molécules signal, les bactéries vont réguler l'expression de gènes cibles, pour la plupart des facteurs de virulence (Lazdunski *et al.*, 2004). Les biofilms étant des systèmes à haute densité cellulaire, le QS va participer à la réponse physiologique des bactéries fixées (Schuster and Peter Greenberg, 2006)

V- 2- 2- Les polysaccharides et la matrice

La matrice qui entoure les bactéries, de par sa localisation et sa nature, contribue au phénotype bactérien « biofilm » (Branda *et al.*, 2005).

Une des adaptations des cellules à leur état de biofilm est la sécrétion de polymères extracellulaires qui représentent 75 à 90 % du biofilm selon les espèces (Costerton, 1999).

Les polysaccharides sont caractéristiques des substances extracellulaires des biofilms (Strathmann *et al.*, 2001; Sutherland, 1998) aussi le terme exopolysaccharides (EPS) ou polysaccharide exocellulaire a été proposé comme appellation générale pour les polymères sécrétés à l'extérieur de la cellule (Sutherland, 1982; Cerning *et al.*, 1994).

Rappelons que certains polysaccharides se trouvent à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme et sont utilisés par la bactérie comme source d'énergie, d'autres sont les composants de la paroi tels les peptidoglycanes et les acides teichoïques (*Bergmaier et al., 2001*).

Les EPS peuvent soit être sécrétés dans le milieu environnant soit rester liés à la cellule sous forme de capsule (*Bergmaier et al., 2001*). Ils appartiennent au "squelette" des biofilms (*Wuertz et al., 2001*). Leur synthèse est exposée en détail par (*Sutherland, 1982*).

Aujourd'hui des applications industrielles des polysaccharides microbiens ont favorisé l'étude de leurs propriétés et de leur production par les cellules bactériennes (*Sutherland, 1982*). Ces études concernent surtout la viscosité et les capacités de gélification des polymères. Une vaste partie des études concerne les systèmes de traitement d'eaux (*Rittmann, 1993*).

Les EPS jouent un rôle majeur dans l'adhésion aux surfaces et l'agrégation des cellules, la résistance aux composés antibactériens, aux métaux, la formation de colonies, la dégradation de composés organiques, la communication entre cellules (*Flett et al., 1989; O'Toole et al., 2000a; de Swaaf et al., 2001; Zhang et Fang, 2001*).

La capsule d'EPS semble également augmenter l'hydrophobie de la surface bactérienne (*Bergmaier et al., 2001*), favoriser l'adhésion, la cohésion et l'intégrité structurale des cellules (*Flemming, 1993*). Il a ainsi été observé que les bactéries du sol peuvent créer leur propre microhabitat en produisant des EPS qui retiennent l'eau durant la dessiccation (*Van Elsas et al., 1997*). Par ailleurs une étude sur *Pseudomonas putida* a mis en évidence une plus abondante production d'EPS dans des conditions d'oxygénation moindre (*Zhang et al., 1998*).

Ainsi dans des conditions concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage et leur permettre de se maintenir (*Bergmaier et al., 2001*).

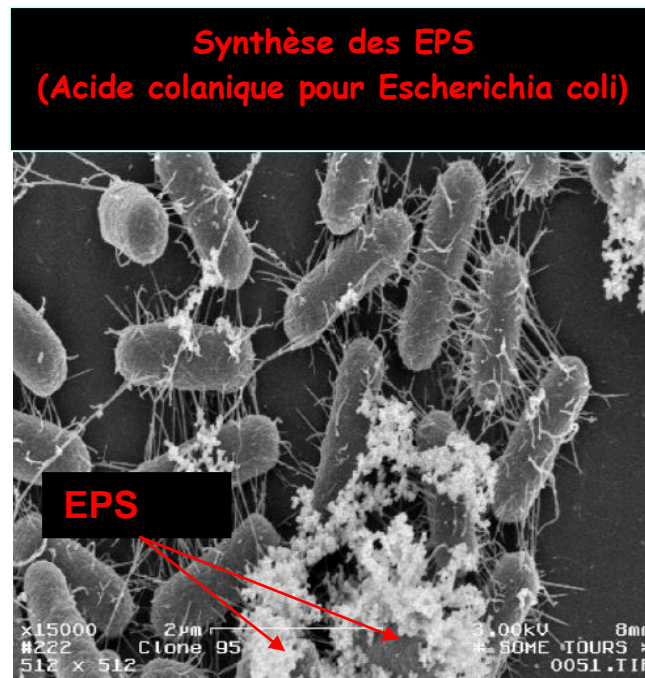


Figure V-2 Synthèse des EPS (Acide colanique pour *Escherichia coli*)

[http:// www.biofilm-pnir.org](http://www.biofilm-pnir.org)

V- 2- 3- L'alginate

Il est connu depuis de nombreuses années que les isolats pulmonaires de *P. aeruginosa* sont fortement muqueux. La mucosité est due à la production d'alginate, un exopolysaccharide produit par *P. aeruginosa*. Contrairement aux flagelles et aux pili, l'expression de *algC* est augmentée d'un facteur quatre en biofilm (Garett et al., 1999).

Dans le cas d'*E.coli*, c'est l'acide colanique qui constitue l'enveloppe muqueuse du biofilm et dont la production est augmentée lors de l'attachement. Alors qu'une souche non muqueuse peut former un biofilm d'une épaisseur de 6μm, une souche muqueuse peut donner un biofilm ayant une épaisseur moyenne de 40μm. L'enrobage des bactéries par une couche d'alginate a un rôle non seulement structural, mais également protecteur. Il a été montré par exemple que des souches non muqueuses forment des biofilms qui ont une résistance beaucoup plus faible

envers la Tobramycine, l'un des antibiotiques les plus utilisés pour lutter contre les infections par *P. aeruginosa*.

V- 2- 4- Adaptation phénotypique

La variation de phase est une stratégie qui permet à la bactérie de s'adapter rapidement à des variations de conditions environnementales. Cette variation est liée à une réorganisation génétique, qui va allumer ou éteindre l'expression d'une série de gènes auxquels sont associés divers traits phénotypiques. Chez les bactéries à Gram négatif, l'expression de nombreuses structures de surface comme les fimbriae sont soumises à cette variation (Sauer et al., 2000). Récemment, Déziel et al. (Déziel et al; 2001) ont mis en évidence l'émergence spontanée de variants de *P. aeruginosa* formant des colonies rugueuses et de petite taille lorsque la bactérie est cultivée dans un milieu statique favorable à la formation d'un biofilm. Les bactéries formant ces colonies ont, à leur surface, d'abondants pili de type IV mais apparaissent dépourvues de twitching mobility aussi bien que de mobilité flagelle. Cependant, contrairement à la forme parentale, ces variants ont une forte capacité d'adhérence. Selon les conditions de culture, les bactéries de chaque type (parentale ou variant) passent d'un phénotype à l'autre avec une fréquence assez élevée. Il semble que la diversité phénotypique déterminée par la variation de phase prenne soin de maintenir, dans la population, des bactéries qui soient parfaitement adaptées à la formation de biofilm, formation qui est alors déclenchée dès que les conditions environnementales s'y prêtent.

On peut définir un phénotype biofilm (Pulcini, 2001). En effet, alors que les bactéries se divisent à l'échelle de quelques minutes dans leur état planctonique, elles arrêtent ce processus pendant des heures lors de leur attachement à une surface. Pendant cette période, se produisent de nombreux changements qui assurent la transition vers la phase biofilm. Des études sur *Pseudomonas aeruginosa* ont mis en évidence des modifications dans l'expression des protéines au moment de cet attachement ce qui confirme l'existence d'un phénotype différent pour les biofilms.

D'autre part pour la plupart des bactéries, l'attachement aux surfaces est très rapidement suivi par la perte de la motilité (Fletcher, 2001). De plus les bactéries sous

forme de biofilms ont tendance à être plus efficaces dans leur utilisation de substrats macromoléculaires que les bactéries seules (Fletcher, 2001).

VI - Méthodes de quantification de l'adhésion

Avant d'évaluer la force d'adhésion proprement dite, avec les difficultés opératoires liées à la complexité des surfaces microbiennes, il est nécessaire de mettre au point des méthodes expérimentales permettant la quantification du niveau d'adhésion pour un microorganisme en contact avec une surface donnée et sa variation en fonction des conditions environnementales.

Dans ce chapitre on va citer quelques méthodes de quantification de la biomasse adhérente, parmi les quelles; la méthode du cristal violet qu'on va utiliser dans notre travail.

VI-1-Méthode par immersion

A-Principe

Cette appellation regroupe l'ensemble des essais pour lesquels la suspension cellulaire est mise en contact avec la surface inerte dans des conditions statiques ou des conditions d'agitation peu maîtrisées. A l'issue d'un temps de contact variable (de quelques minutes à plusieurs jours), le support est la plupart du temps rincé et les microorganismes restant adhérents sont comptés sous microscope optique, avec ou sans marquage préalable. Les microorganismes peuvent également être dénombrés après avoir été détachés du support par sonication.

B-Limites

Les procédures de rinçage sont le plus souvent non standardisées (par exemple, un rinçage « doux », préconisé sans autre précision, est effectué) et vont dépendre de l'opérateur, rendant ainsi impossible toute comparaison entre des résultats provenant de différents laboratoires.

Par ailleurs, pendant le rinçage, les microorganismes adhérents sont soumis à des forces de détachement relativement importantes. Ainsi, un rinçage « doux » soumet le microorganisme à une force de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-10} N (Visser, 1976). Mais le simple fait de sortir la lame de la suspension cellulaire se révèle de loin le plus drastique. En

effet, cette dernière étape correspond à l'établissement d'une interface eau-air, ce qui se traduit par des forces de détachement de l'ordre de 10^{-7} N (Leenars, 1988; Leenars et O'Brien, 1989). Ces forces, le plus souvent appliquées de manière non intentionnelle, conduisent en fait à évaluer la rétention du microorganisme sur le support plutôt que sa réelle adhésion.

VI-2-Les microplaques

Cette technique n'est qu'une variante de la précédente. En effet, elle consiste à faire adhérer la suspension cellulaire au fond et sur les parois d'une plaque « 96 puits ». Les procédures de rinçage et de marquage sont du même type que dans la technique d'immersion. Cette technique est qualifiée de technique « haut-débit » car elle permet une lecture rapide et automatisée des résultats. Elle est notamment utilisée pour réaliser des criblages, par exemple pour évaluer la sensibilité de biofilms à une palette d'antibactériens ou d'antifongiques selon le biofilm considéré (Ramage et al., 2001).

VI-3-La microscopie électronique à balayage

C'est à la microscopie électronique à balayage que l'on doit les premières données sur la structuration des biofilms. Bien que largement controversée aujourd'hui, notamment car elle présente un risque de dénaturation de l'échantillon biologique, dû à la fixation artificielle des structures, au recouvrement par un film métallique et au travail sous vide, elle offre encore de nombreuses informations. Ainsi, (Nett et Andes 2006) présentent une belle illustration de la structure bi-dimensionnelle d'un biofilm formé par *C. albicans* (voir figure VI -1).

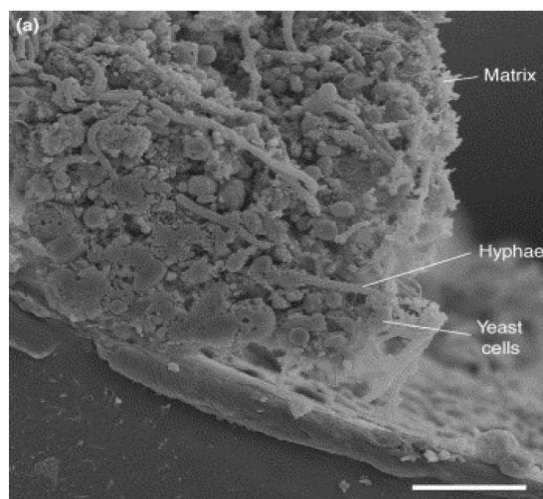


Figure VI -1 : Photo de microscopie électronique à balayage d'un biofilm formé par *C. albicans* sur un cathéter vasculaire implanté sur un rat. L'épaisseur du biofilm est d'environ 200 μm . On peut voir les blastopores et les hyphes inclus dans la matrice. (Nett and Andes, 2006).

VI -4-La microscopie confocale

Cette technique est particulièrement intéressante pour étudier la structuration de l'espace du biofilm mature. C'est en utilisant cette technique que Chandra et al. (2001) ont pu mettre en évidence l'effet de la nature du support sur l'architecture du biofilm. Ce dernier est formé dans une petite cellule directement placée sous le microscope, évitant ainsi la création d'interface dommageable avec l'air. L'observation de la structure 3D est rendue possible par reconstruction d'images.

VI-5-La microscopie à force atomique

Actuellement, la microscopie à force atomique (AFM) est peut-être la technique la plus précise utilisée pour étudier les premières étapes de la formation du biofilm.

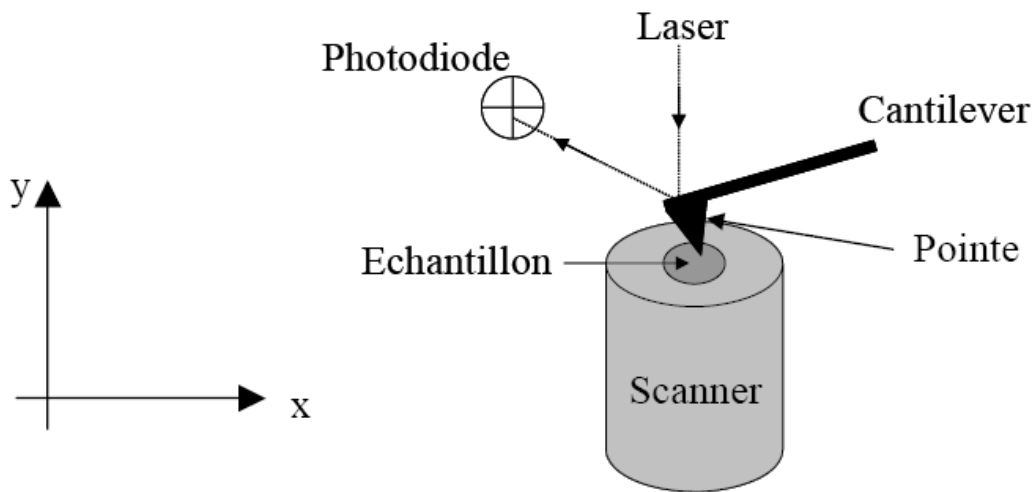


Figure VI -2- Principe général de l'AFM.

L'un des avantages de l'AFM est la possibilité de travailler sur des échantillons en milieu liquide. Les images obtenues par AFM ne sont pas générées par un rayonnement lumineux incident comme en microscopie optique classique, mais par la mesure de la force existante entre une pointe et la surface d'un échantillon (Binnig et al., 1986).

Dufrêne (2002) (Figure VI -2) expose le principe simplifié de cette technique. Une image est obtenue suite à l'enregistrement de l'évolution de cette force quand la pointe balaye l'échantillon dans les dimensions x et y de l'espace. De plus, l'échantillon étant monté sur un support piézoélectrique, un positionnement dans les trois dimensions de l'espace est possible.

La pointe est fixée sur un cantilever déformable qui agit comme un ressort. Sa déformation -ou déflexion- est mesurée à l'aide d'un laser focalisé sur la partie libre du cantilever, le rayon réfléchi étant détecté par une photodiode. Une forte déflexion du cantilever révèle une force d'attraction globale importante entre la pointe et l'échantillon. De nombreuses approches expérimentales ont été développées afin de mesurer la force d'interaction entre un microorganisme et un support.

L'une d'elles consiste à « attacher » directement le microorganisme sur la pointe puis à déterminer l'évolution des courbes force-retrait entre ce microorganisme et le support

d'intérêt (Ong et al., 1999). Cependant, la pointe étant plus large que le microorganisme, il est difficile de conclure quant à l'influence « parasite » de la pointe sur la déflexion engendrée (Klein et al., 2003). Il faut, de plus, noter que la phase critique de cette manipulation est l'« attachement » de la cellule sur la pointe. En effet, l'architecture macromoléculaire de la membrane du microorganisme peut être dénaturée. Un moyen de préserver cette architecture serait de le faire adhérer par interactions spécifiques (Benoit et al., 2000). Une autre approche proposée par Lower et ses collaborateurs (Lower et al., 2001) consiste à fixer sur la pointe des billes portant des fonctions amines, sur lesquelles ont adhéré les bactéries. Il est également possible de préparer un tapis bactérien, et d'étudier les interactions de la pointe avec ce tapis (van Der Mei et al., 2000).

L'AFM se révèle donc être l'outil nanométrique d'avenir pour la mesure des forces d'interaction car elle présente une sensibilité de mesure suffisante.

VI-6- Les pinces optiques

Les pinces optiques permettent d'attraper, de manipuler et de déplacer, grâce à un rayonnement laser, une cellule vivante sans l'endommager (Block et al., 1989; Visscher et al., 1993). De plus, si l'appareil est correctement calibré, il permet une quantification des forces mises en œuvre dans le détachement (Svoboda et Block, 1994; Simmons et al., 1996). La force optique, proportionnelle à la puissance du rayon incident, dépend de la taille, de la forme et de l'indice de réfraction de l'objet piégé.

VI -7- Les chambres à écoulement

Contrairement aux techniques précédentes, les chambres à écoulement sont utilisées pour étudier l'adhésion et le détachement des microorganismes aux surfaces inertes dans des conditions hydrodynamiques contrôlées, sans que ces derniers ne soient soumis à une quelconque interface eau-air, qui s'avérerait, le cas échéant, préjudiciable.

Plusieurs types de dispositifs ont été développés. L'écoulement peut être, selon la géométrie de la chambre, radial ou longitudinal. Les forces exercées sur les cellules sont alors des forces hydrodynamiques de pression et/ou de cisaillement.

Les observations in situ directes, combinées à un traitement ultérieur des images, rendent

alors possible soit l'étude de l'organisation des premières couches du biofilm dans les deux dimensions de l'espace, soit l'étude du détachement des microorganismes.

Le contrôle strict des conditions hydrodynamiques à l'intérieur de la chambre permet d'accéder à de nombreuses données expérimentales, telles que la contrainte de cisaillement nécessaire au détachement des microorganismes et même, sur la base de quelques hypothèses simplificatrices, la force d'adhésion du microorganisme sur le support.

VI -6- la méthode du cristal violet

Cette méthode est souvent utilisée pour la quantification du biofilm, car c'est une méthode simple et non coûteuse.

La méthode est principalement basée sur la rétention d'une quantité du cristal violet proportionnel à la biomasse adhérente.

La méthode du cristal violet est une méthode semi-quantitative, puisque le cristal violet est retenu par toute entité adhérente sur le support quel que soit sa nature

VII-Le genre *Entérocooccus*

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont des cocci Gram positive aéro-anaérobie, catalase négative, résistant à la pénicilline, initialement nommée streptocoques fécaux en raison de leur habitat au niveau du tube digestif ou streptocoques D par appartenance au niveau du tube digestif ou streptocoques D par leur appartenance au Séro-groupe D dans la classification Lancefield.

La classification générale des streptocoques fécaux a été modifiée dans les années 80 par la création d'un nouveau genre, *Enterococcus*. Dans ce contexte, plusieurs espèces appartenant antérieurement au genre *Streptococcus* ont été transférées vers le genre *Enterococcus*, sur la base d'étude génomique (Didi Raoult).

On les retrouvent souvent dans le tractus gastro-intestinal des humains et de plusieurs animaux; *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain (Clausen et al., 1977; Gleeson et Gray, 1997).

Cette bactérie réagit à la coloration gram positif et apparaît sous la forme de chaînette.

Il existe quatre espèces principales d'entérocoque :

- *Enterococcus faecium* vivant en commensal (avec d'autres germes) dans le tube digestif
- *Enterococcus faecalis* vivant également en commensal dans le tube digestif
- *Enterococcus durans*
- *Enterococcus liquifaciens*
- *Enterococcus zymogenes*

Les espèces entérocoques *faecalis* et entérocoques *faecium* sont des espaces à l'origine d'infections chez les patients âgés, fragilisé, mais également rencontrant une diminution de la barrière de défense qu'elle soit située niveau des muqueuses (couche de cellules recouvrant l'intérieur des organes creux en contact avec l'air comme l'intestin par exemple) ou épithéliales (comme la peau entre autres).

Le genre *Enterococcus* comprend plus de quinze espèces. Les plus fréquemment isolées en pathologie humaine sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

VII-1-Caractères bactériologiques

Les *entérocoques*, comme les streptocoques D, possèdent l'antigène D et hydrolysent l'esculine. La principale différence phénotypique entre les deux genres est que, contrairement aux *streptocoques*, les *entérocoques* se développent dans un milieu hypersalé (6,5 % de NaCl).

Les caractères qui différencient les *entérocoques* et les *streptocoques* D sont résumés : ci-dessous (Tableau VII-1) :

	<i>Enterococcus</i>			<i>Streptococcus</i> (D)	
	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>durans</i>	<i>bovis</i>	<i>equinus</i>
antigène D	+	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+	+
NaCl 6,5 %	+	+	+	-	-
Résistance au Tellurite	+	-	-	-	-
mannitol	+	+	-	+	-
raffinose	-	-	-	+	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
culture à 45°	+	+	+	+	+

VII-2-Habitat - pouvoir pathogène chez l'homme

Les *entérocoques* sont des commensaux habituels des flores bucco-pharyngées et intestinales de l'homme et des animaux.

Ils sont isolés au cours :

- d'infections urinaires,
- il s'agit d'infections primitives ou de surinfections chez les hospitalisés ou chez les malades atteints de lithiase,
- d'infections cutanées, sur plaies, brûlures, ulcères, escarres,

- d'infections génitales et périnéales,
- d'infections biliaires, péritonéales, appendiculaires,
- de suppurations des plaies chirurgicales,
- d'infections dentaires,
- d'otites - sinusites,
- d'endocardites (OSLER) et bactériémies.

Les *entérocoques* sont, seuls ou en association, au troisième rang des agents responsables d'infections nosocomiales.

VII-3-Méthodes d'analyse

Les *entérocoques* sont des bactéries à gram positif qui se présentent sous forme de coques en courtes chaînes. Ils peuvent notamment hydrolyser l'esculine en présence de 40 % de bile et ont la capacité de croître à une température entre 10 et 45°C, à un pH alcalin de 9,6, dans une solution contenant 6,5 % de NaCl (CEAEQ, 2000;(Facklam et al., 1999; Hancock et Gilmore, 2000); ces caractéristiques sont utilisées pour leur identification. Les *entérocoques* peuvent être détectés en milieu liquide (dilution en tubes multiples – méthode du nombre le plus probable) ou sur gélose lors d'une filtration sur membrane (FM); cette dernière est considérée comme étant la mieux adaptée à l'eau potable (Clausen et al., 1977; APHA-AWWA-WEF, 1998).

VII –4-Diagnostic bactériologique

Il repose uniquement sur la mise en évidence de la bactérie.

Les prélèvements sont variés : pus, urines, selles ou sang par hémoculture.

On ensemence sur des milieux ordinaires et sélectifs (Bile-Esculine)L'identification repose sur les caractères cultureux, biochimiques et antigéniques (antigène D) indiqués dans le tableau ci-dessus.

Les infections moins graves telles que les infections urinaires répondent bien à un traitement par la pénicilline, l'ampicilline ou l'amoxicilline.

La présence d'*entérocoques* dans l'intestin est habituelle et ne mérite pas de traitement.

VII-5- Adhésion et pathogénéité d'*Enterococcus faecalis*

Afin de produire une infection, les entérocoques doivent être capables de coloniser les tissus hôtes, résister à des mécanismes de défense de l'hôte non spécifique et le système immunitaire et de produire des changements pathologiques. En ce qui concerne la colonisation des tissus de l'hôte, les tests de l'adhésion ont montré que les entérocoques peuvent se fixer aux cellules des voies intestinales et urinaires épithéliales et des cellules cardiaques par l'intermédiaire d'adhésines exprimées à la surface bactérienne. L'expression de ces adhésines par les entérocoques a montré en outre d'être affectée par les conditions de la croissance bactérienne. *Enterococcus faecalis* *in vitro* En outre, l'adhésion d'*Enterococcus faecalis* aux cellules tubulaires rénales *in vitro* est améliorée si les organismes produisent la substance d'agrégation.

VII-6- Traitement

Les entérocoques sont résistants aux céphalosporines (antibiotiques) de troisième génération qui ne doit plus être utilisée contre les infections à entérocoque. De ce fait, le traitement des infections par entérocoque est problématique. Néanmoins des tentatives ont été faites avec la benzylpénicilline, l'ampicilline et la gentamicine. Il a également été tenté l'utilisation de la vancomycine de la gentamicine chez les patients allergiques à la pénicilline.

Partie II

Partie expérimentale

I- Matériel et méthodes

I-1- Modèle biologique

La souche bactérienne retenue dans notre étude est une souche pure d'*Enterococcus faecalis*, que nous avons isolée à partir de dents monoradiculées.

De nombreuses bactéries ont fait l'objet d'études en raison de leur capacité à former des biofilms. Parmi lesquelles, *Enterococcus faecalis*, a été, pour plusieurs raisons, choisie pour mener cette étude. En effet, cette bactérie occupe une place importante dans le domaine du contrôle de la qualité microbiologique de l'eau.

Aussi cette bactérie est impliquée dans divers problèmes environnementaux. Dans les hôpitaux, *Enterococcus faecalis* est l'une des bactéries beaucoup incriminées dans les maladies nosocomiales.

II - Méthodes

II-1- Isolement d'*Enterococcus faecalis*

II-1- 1 Prélèvement des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés à partir de dents monoradiculées, atteintes de gangrène pulpaire. Après extraction des dents, les surfaces radiculaires sont soigneusement nettoyées avec du sérum physiologique. Les couronnes dentaires sont ensuite sectionnées avec une fraise turbine stérile.

Les prélèvements bactériologiques sont immédiatement effectués selon les étapes suivantes :

1. Déposer quelques gouttes de sérum physiologique à l'entrée du canal
2. Introduire un instrument de préparation stérile (lime k n° 10 ou 15)
3. Faire un limage circonférentiel pour éliminer la dentine suivie de mouvements de pompage.
4. Introduire une par une des pointes de papier stérile pour absorber le contenu du canal.
5. Les pointes sont immédiatement introduites dans un tube stérile contenant 9 ml de BGT
6. Le tube est hermétiquement fermé et mis dans une glacière à 4°C

7. Les prélèvements sont acheminés vers le laboratoire de microbiologie dans les meilleurs délais.

II -1- 2- Isolement et purification

L'isolement a été effectué sur milieu M17 à pH 7. Il a été réalisé par simple ensemencement en surface à l'aide de stries transversales à partir d'une quantité de 50 microlitre préalablement déposée. L'incubation se fait à 30°C pendant 48 heures en conditions d'anaérobiose ; en déposant les boîtes ensemencées dans une jarre en présence de générateurs de gaz « Gaz PakTM EZ » Les colonies suspectes (colonie rondes et blanchâtre) sont soigneusement prélevées et repiquées de nouveau sur milieu M17. La pureté de la souche est contrôlée à l'aide d'observations microscopique après coloration de Gram.

II -1- 3 - Identification de la souche

L'identification de la souche d'*Enterococcus faecalis* est effectuée en tenant compte du critère morphologique des colonies obtenues sur le milieu de culture, de la morphologie cellulaire ainsi que du test de la catalase. Ainsi, seules les souches Gram positif et en forme coques (cocci), dépourvus de catalase seront retenues. L'identification est réalisée par l'utilisation des galeries biochimiques API 20 Strep (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). La galerie API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant nous permettant de mettre en évidence la souche *Enterococcus faecalis*.

II- 2 -Protocole de l'adhésion et de quantification

II- 2 -1- Adhésion

Une suspension bactérienne est préparée dans le milieu M17 à partir d'une culture jeune d'*Enterococcus faecalis*. La densité optique de la suspension est ajustée à l'aide de dilutions, jusqu'à l'obtention de la valeur désirée, Puis la suspension est répartie dans des tubes selon nature désirée (verre et polystyrène dans notre cas). Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 20 heures.

A l'issus de chaque période d'incubation, chaque tube correspondant est soigneusement vidé de la culture bactérienne et les parois sont débarrassées des cellules planctoniques non adhérentes avec rinçages à l'Eau Distillée.

II- 2 -2 - Quantification de la biomasse fixée

Méthode du cristal violet

La quantification de la biomasse fixée est faite selon la méthode du cristal violet.

La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration au CV à 1 % (1 g de la poudre de cristal violet dans 100 ml d'eau distillée). Un temps de contact de 45 mn est estimé pour la coloration.

Ensuite l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'eau Distillée. Les tubes sont enfin égouttés et sécher à l'air libre.

La biomasse fixée est récupérée avec la solubilisation du cristal violet fixé sur les parois du tube à l'aide d'une solution d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25). L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre « modèle SECOMAM ». La masse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

II-3- Détermination de l'hydrophobicité d'*Entérocooccus faecalis*

Technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) (Pelletier *et al*, 1997; Temmerman, 2003).

L'adhésion microbienne aux solvants, communément appelé MATS, pour *Microbial Adhésion To Solvents*, est une technique inspirée de la méthode d'adhésion aux hydrocarbures (MATH pour *Microbial Adhésion To Hydrocarbon*) (Rosenberg, 1980), et couramment employée pour déterminer l'hydrophobicité relative des cellules microbiennes, ainsi que leur caractère acide-base au sens de Lewis (Bellon-Fontaine *et al*, 1996).

Les souches bactériennes sont mises en culture à 37°C durant 20 h dans le bouillon M17 à partir d'une culture jeune d'*Enterococcus faecalis*.

Les suspensions bactériennes ainsi sont centrifugées pendant 15 minutes à 1000g à l'aide d'une centrifugeuse de marque SIGMA® 3-16K Fisher Bio block Scientific. Le culot obtenu est lavé deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile à 0.1 N et remis en suspension dans le même tampon, la densité optique A_0 est fixée entre 1 et 8.

3ml de la suspension bactérienne obtenue sont introduits dans un tube à essai stérile et additionnés de 250 μ l du solvant apolaire qui est l'exadécane. Le mélange est agité au vortex pendant environs 1 minute puis Le mélange est laissé à décanter 15 minutes pour avoir une séparation complète entre les phases organique et aqueuse. Ensuite la densité optique A de la phase aqueuse est mesurée à 600 nm.

II-4- Effet du pH sur l'adhésion d'*Ec.faecalis*

Afin d'étudier l'influence du pH sur l'adhésion d'*Ec.faecalis*, Des suspensions bactériennes à différents pH (3, 5, 7.3, et 9) ont été aseptiquement préparé dans le bouillon M17 à partir d'une culture jeune d'*Enterococcus faecalis* incubée durant 20 h dans la gélose M17.

La densité optique de chaque suspension est ajustée, à l'aide de dilutions, jusqu'à l'obtention d'une valeur $DO = 0,30$ mesurée à une longueur d'onde 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre « modèle SECOMAN», Puis la suspension est répartie dans des tubes de 5 ml en polystyrène ou en verre à raison de 3 ml par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 20 heures.

A l'issus de chaque période d'incubation ; la densité optique de la suspension de chaque tube correspondant est mesurée, puis chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et les parois sont débarrassées des cellules planctoniques avec rinçages à l'eau Distillée.

Enfin la biomasse fixée est quantifié selon la méthode du cristal violet.

La quantité du cristal violet retenu est proportionnelle à la biomasse adhéree (Figure II-1), la dissolution du cristal violet retenu se fait à l'aide d'un mélange Acétone-Ethanol (Figure II-2), afin de récupérer les bactéries qui ont adhéré.

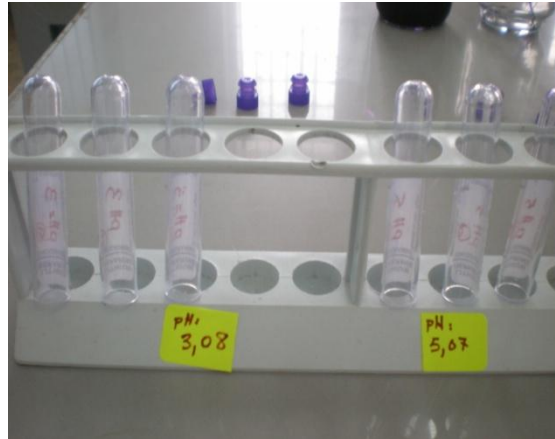


Figure II-1. La biomasse fixée d'*Entérocooccus faecalis* après coloration au cristal violet



Figure II-2 : Récupération de la biomasse fixée d'*Entérocooccus faecalis* à l'aide d'un mélange Acétone-Ethanol

II-5- Effet de CaCl_2 sur l'adhésion d'*Ec.faecalis*

Afin d'étudier l'influence du CaCl_2 sur l'adhésion d'*Ec.faecalis*, Des suspensions bactériennes à différentes concentrations (0,1 ; 0,26 ; 0,5 ; et 1mg/L) en CaCl_2 ont été aseptiquement préparé dans le milieu M17 à partir d'une culture jeune d'*Enterococcus faecalis*.

La densité optique de chaque suspension est ajustée à l'aide de dilutions, jusqu'à l'obtention d'une valeur de DO = 0,30 ; mesure à une longueur d'onde 570 nm a l'aide d'un spectrophotomètre « modèle SECOMAN», Puis la suspension est répartie dans des tubes en polystyrène de 5 ml à raison de 3 ml par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 20 heures.

A l'issus de chaque période d'incubation ; la densité optique de la suspension de chaque tube correspondant est mesurée, puis chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et les parois sont débarrassées des cellules planctoniques non adhérees avec rinçages à l'Eau Distillée.

Enfin la biomasse fixée est quantifié selon la méthode du cristal violet

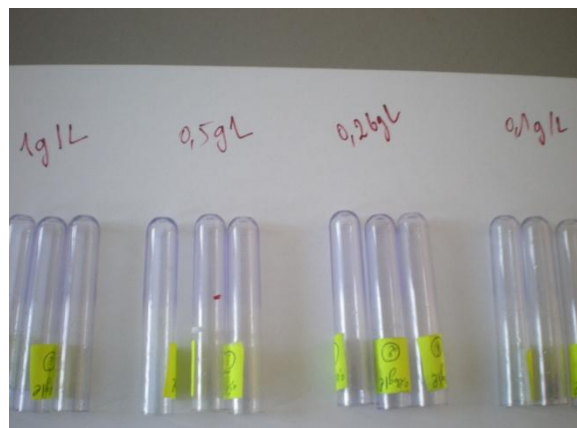


Figure II-3 : Biomasse adhéree pour les différentes concentration en CaCl_2

III-Résultats et discussions

III-1- Résultats de l'isolement et purification

Après isolement et purification, le repiquage de la souche sur gélose M17 a donné des colonies suspectes de forme ronde et couleur blanchâtre (Figure III-1).

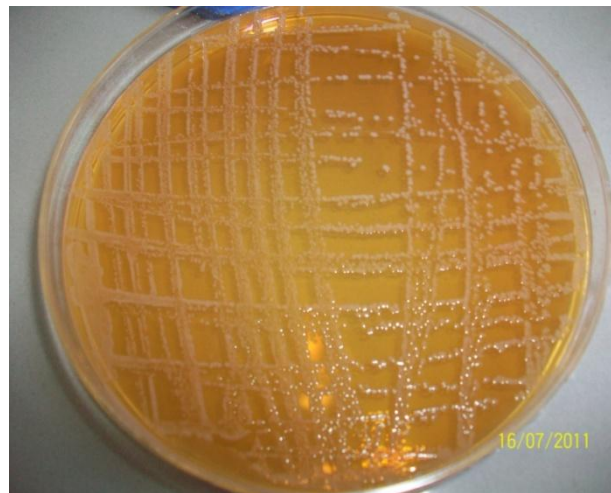


Figure III-1 : Aspect des colonies sur gélose M17

Le résultat de repiquage de la souche sur gélose au sang frais est présenté : (Figure III-2)



Figure III-2 : Aspect des colonies sur gélose au sang frais

III-2- Identification de la souche

1- Coloration de gram

La coloration de gram a donné des colonies violettes sous forme de chaîne (figure II-6)

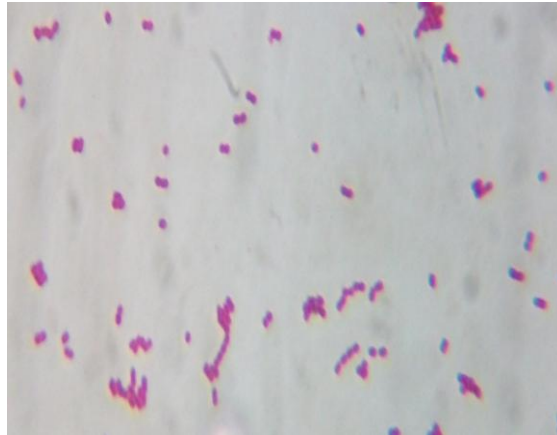


Figure II-6 : Aspect microscopique de la souche après coloration de Gram

2- Test de catalase

Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie **API 20 Strep.**

VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-



Figure II-7 : Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie **API 20 Strep.**

III-3- Résultat de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en aérobiose en fonction du pH sur le polystyrène

Les résultats de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en aérobiose sur le polystyrène en fonction du pH sont portées : (Tableau II-1).

Tableau II- 1 : Résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en aérobiose dans des tubes en polystyrène

pH	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i>	Adhésion d' <i>Ec.faecalis</i>
3,08	0,40 ± 0,01	0,14 ± 0,02
5,07	0,88 ± 0,01	0,16 ± 0,04
7,3	2,10 ± 0,03	0,30 ± 0,05
9	2,01 ± 0,02	0,20 ± 0,02

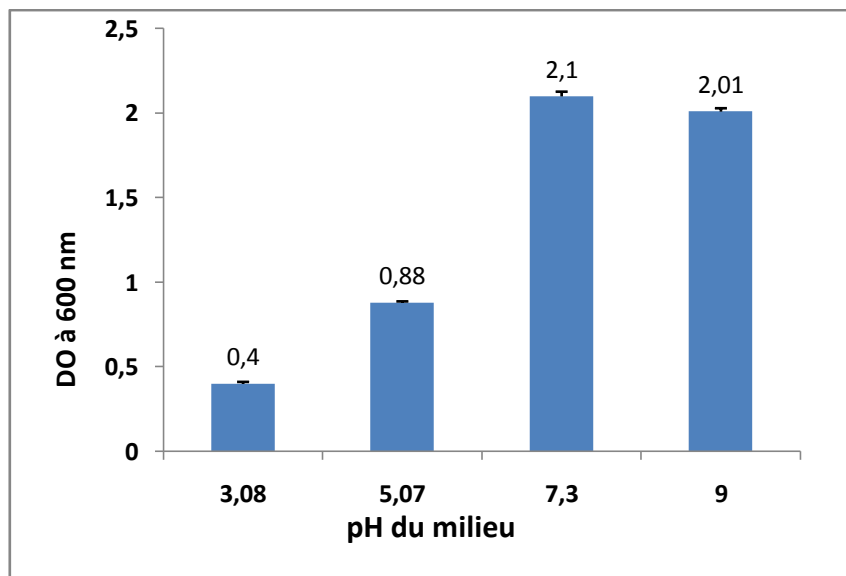


Figure II - 8 : Croissance d'*Ec.faecalis* dans le polystyrène en aérobiose dans du M17 en fonction du pH

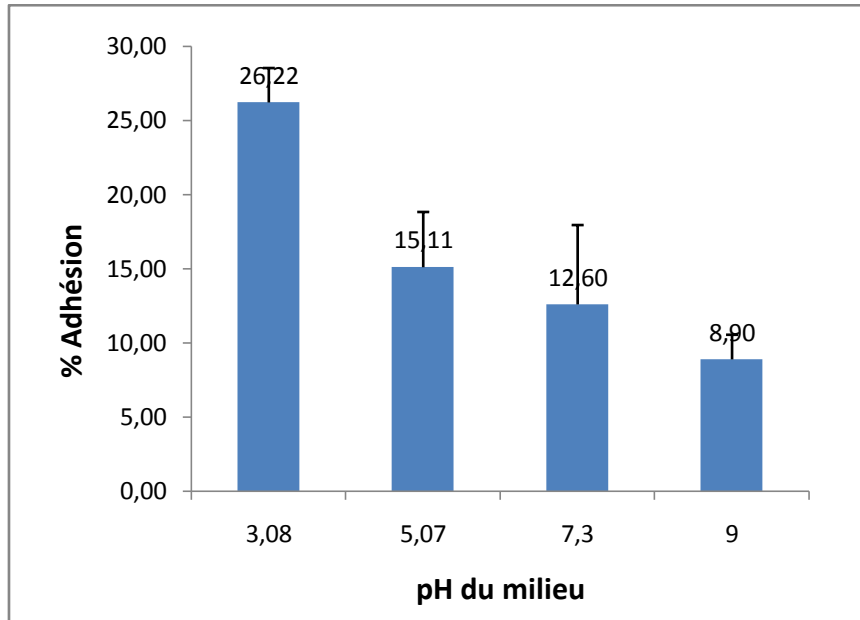


Figure II - 9 : Taux d'adhésion d'*Ec.faecalis* en aérobiose dans le bouillon M17 sur le polystyrène en fonction du pH

III-4- Résultat de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose en fonction du pH sur le polystyrène

Les résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en aérobiose sur le polystyrène en fonction du pH sont portées : (Tableau II- 2).

Tableau II-2 : Résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en fonction du pH en anaérobiose sur le polystyrène

pH	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i>	Adhésion d' <i>Ec.faecalis</i>
3,08	0,64 ± 0,02	0,18 ± 0,00
5,07	0,82 ± 0,04	0,12 ± 0,02
7,3	2,08 ± 0,01	0,46 ± 0,09
9	2,09 ± 0,00	0,13 ± 0,00

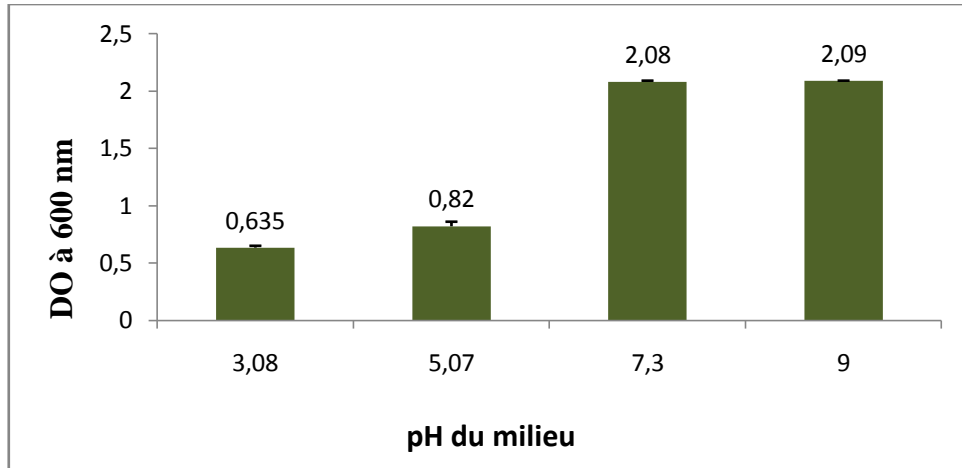


Figure II - 10 : Croissance d'*Ec.faecalis* en anaérobiose dans le bouillon M17 en fonction du pH sur le polystyrène

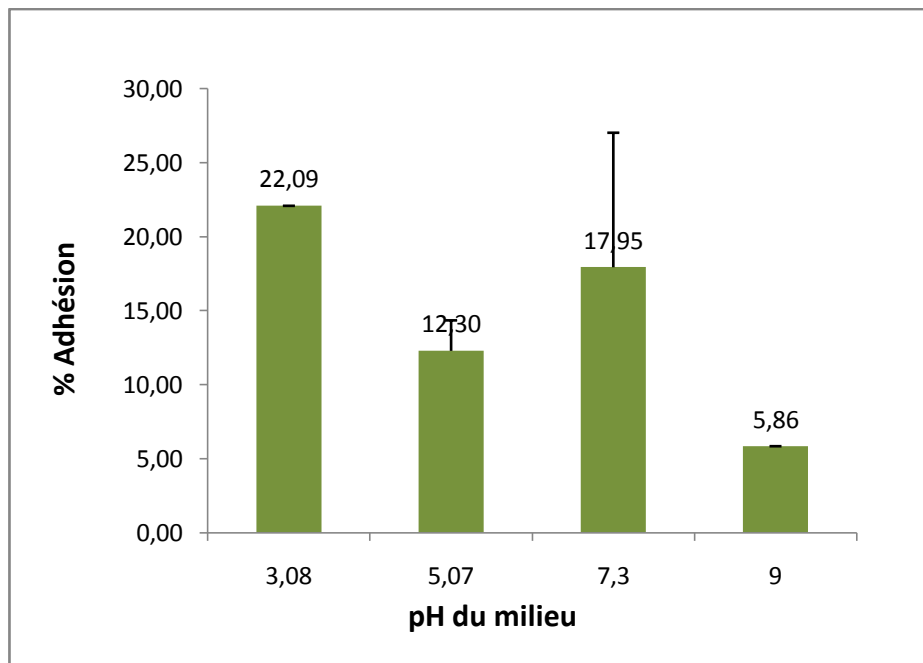


Figure II - 11 : Pourcentage d'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose dans le bouillon M17 en fonction du pH sur le polystyrène.

III-5- Résultat de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose sur le verre utilisé en fonction du pH

Les résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose sur le verre déjà utilisé déjà ; en fonction du pH sont portées : (Tableau II.3).

Tableau II-3 : Résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en fonction du pH en anaérobiose sur le verre utilisé

pH	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i>	Adhésion d' <i>Ec.faecalis</i>
3,08	0,62 ± 0,04	0,15 ± 0,01
5,07	0,77 ± 0,02	0,45 ± 0,08
7,3	2,08 ± 0,03	0,82 ± 0,02
9	2,08 ± 0,01	0,26 ± 0,17

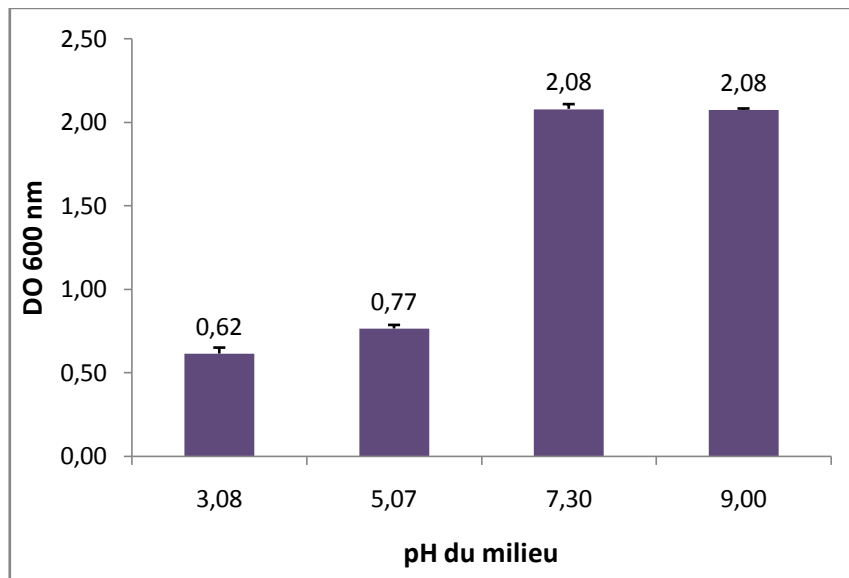


Figure II - 12 : Croissance d'*Ec.faecalis* en anaérobiose dans des tubes en verre utilisé en fonction du pH

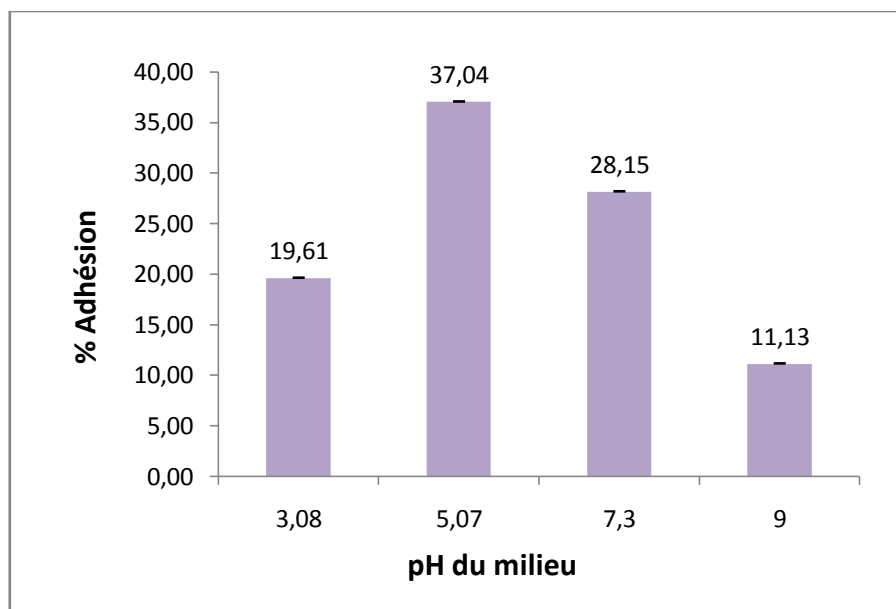


Figure II - 13 : Pourcentage d'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose dans des tubes en verre utilisé en fonction du pH

III-6- Résultat de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose sur le verre neuf

Les résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en aérobie sur le verre neuf en fonction du pH sont portés : (Tableau 4).

Tableau II - 4 : Résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose sur le verre neuf

pH	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i>	Adhésion d' <i>Ec.faecalis</i>
3	0,27 ± 0,02	0,16 ± 0,02
5	0,72 ± 0,01	0,18 ± 0,02
7,3	1,71 ± 0,04	0,24 ± 0,02
9	1,59 ± 0,06	0,17 ± 0,05

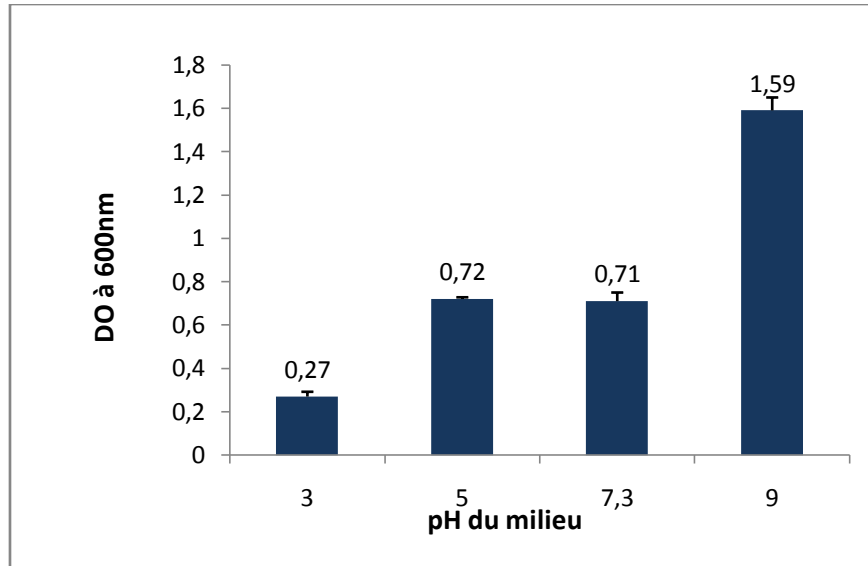


Figure II - 14 : Croissance d'*Ec. faecalis* en anaérobiose dans du bouillon M17 en fonction du pH dans des tube en verre neuf

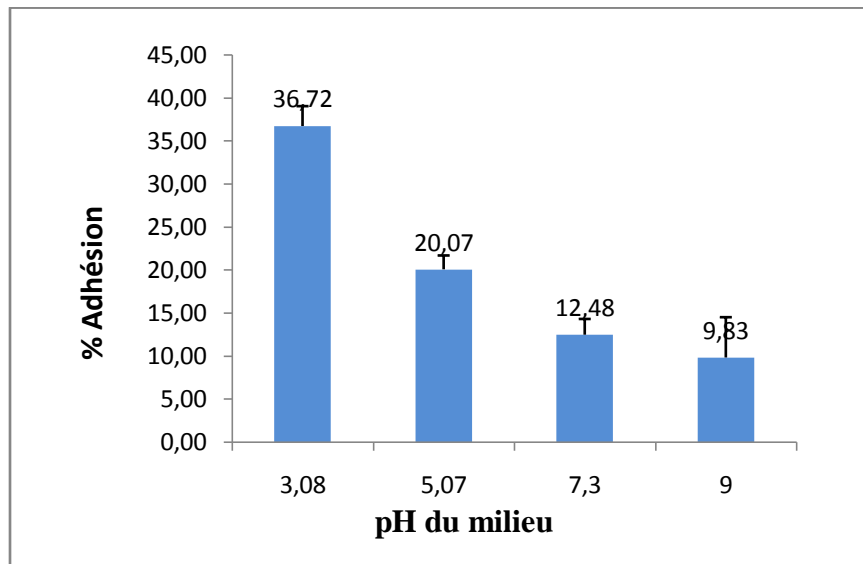


Figure II - 15 : Taux d'Adhésion d'*Ec. faecalis* en anaérobiose dans du M17 dans des tube en verre neuf en fonction du pH

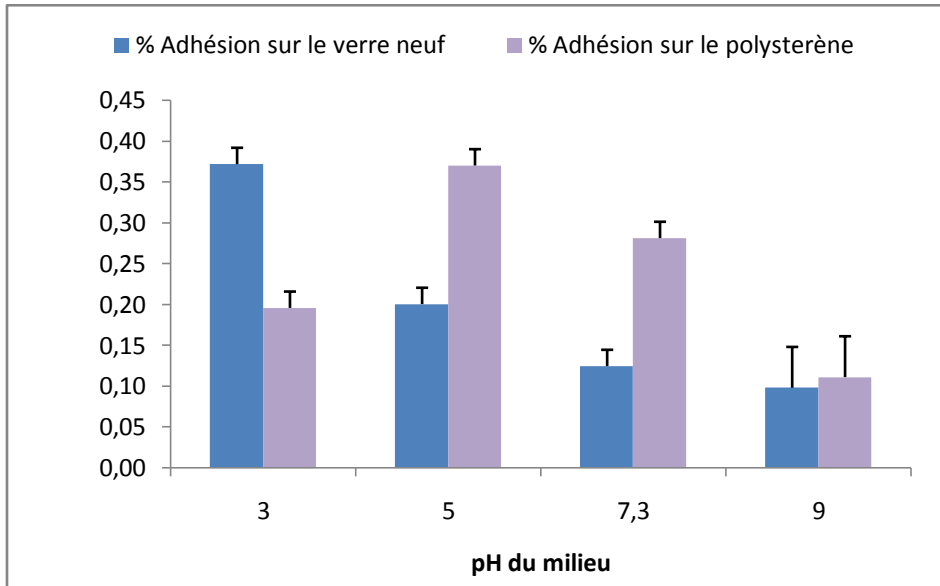


Figure II - 17 : Comparaison de l'Adhésion d'*E.faecalis* sur le verre neuf et le polystyrène dans du M 17 en anaérobiose et en fonction du pH

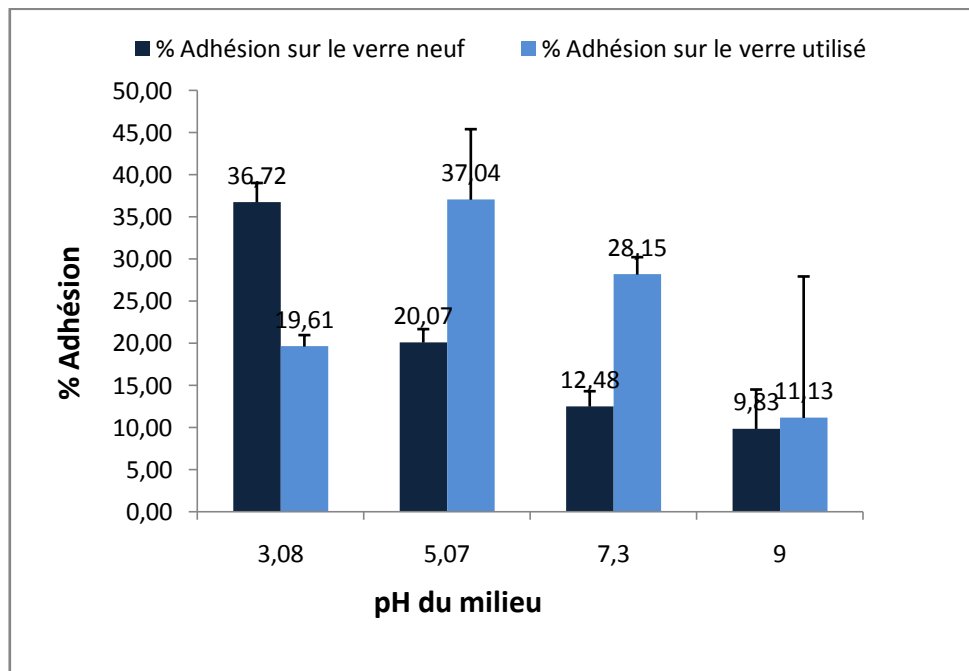


Figure II - 18 : Comparaison de l'Adhésion d'*E.faecalis* sur le verre neuf et le verre utilisé dans du M 17 en anaérobiose et en fonction du pH

III-7- Résultat de l'adhésion en présence de CaCl_2

Les résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose sur le polystyrène en fonction de la concentration du CaCl_2 sont portés : (Tableau II-5).

Tableau II-5 : Résultats de la croissance et de l'adhésion d'*Ec.faecalis* en anaérobiose sur le polystyrène en fonction de la concentration de CaCl_2

[CaCl_2] (mg/L)	Croissance d' <i>Ec.faecalis</i>	Adhésion d' <i>Ec.faecalis</i>
0(Témoin)	2,08 ± 0,01	0,46 ± 0,09
0,1	2,03 ± 0,05	0,08 ± 0,00
0,26	2,02 ± 0,01	0,12 ± 0,01
0,5	2,06 ± 0,01	0,11 ± 0,01
1	1,93 ± 0,09	0,09 ± 0,01

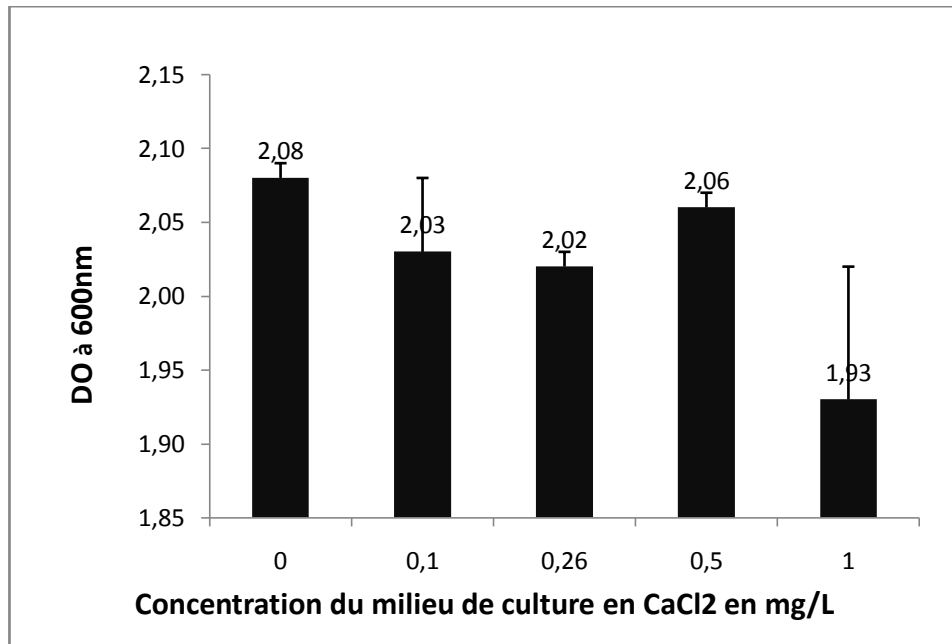


Figure II - 19 : Croissance d'*Ec.faecalis* sur le polystyrène dans du M 17 en anaérobiose en fonction de la concentration en CaCl_2

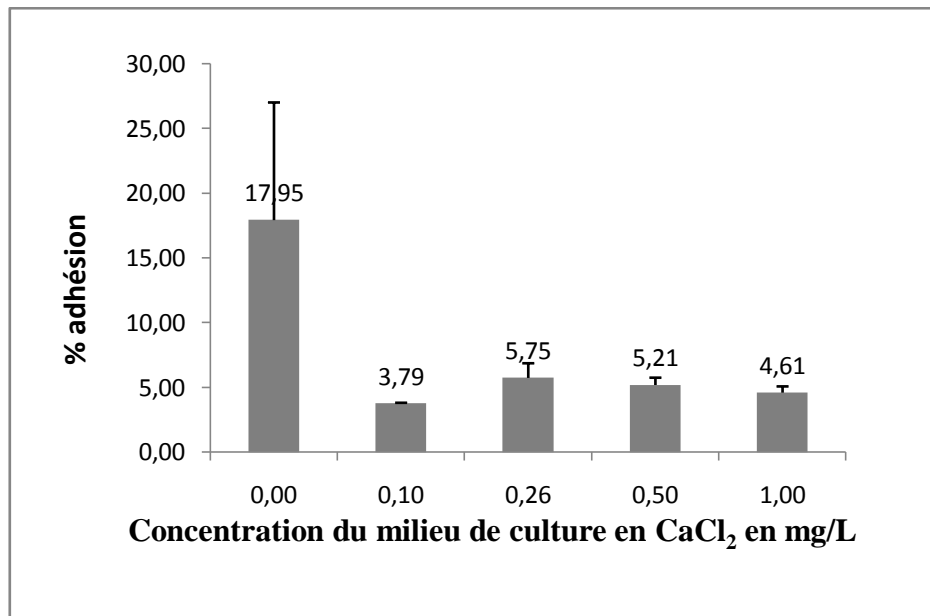


Figure II - 20 : Taux d'adhésion d'*Ec.faecalis* sur le polystyrène dans du M 17 en anaérobiose en fonction de la concentration en CaCl₂

III-8-Mesure de l'hydrophobicité d'*Ec.faecalis*

Le test BATH (*Bacterial Adhesion To Hydrocarbon*)

La détermination de l'hydrophobicité des bactéries se fait par utilisation des solvants apolaires (décane, hexadécane, xylène, toluène...) et la présence de protéines résulte dans l'augmentation de l'affinité des bactéries à ces solvants (Olivier *et al*, 2007).

Dans notre étude on a utilisé l'hexadécane, qui est un solvant apolaire.

Après un repos permettant la séparation des phases (Figure II - 21) la DO₅₇₀ de la phase aqueuse (A₀) est lue à 570nm, permettant ainsi l'obtention du pourcentage des bactéries qui ont adhéré au solvant par la formule suivante :

$$\% \text{ adhésion} = (1 - A/A_0) * 100$$

$$\% \text{ adhésion} = 39,25$$

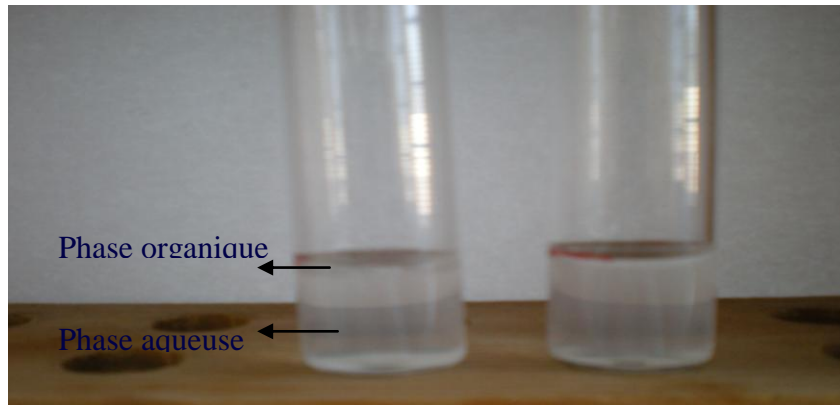


Figure II - 21 : Séparation des deux phases : organique et aqueuse après décantation.

III-3-Discussions

Hydrophobicité et adhérence; Le test BATH est fréquemment utilisé pour évaluer l'hydrophobicité de la paroi cellulaire bactérienne, ainsi son adhérence. Dans ce test, la suspension bactérienne est mélangée avec un liquide d'hydrocarbure sous des conditions bien contrôlées. Après mélange, si les cellules sont hydrophobes, elles adhèrent à la phase apolaire et montent avec cette dernière. Si les cellules sont hydrophiles, elles restent dans la phase aqueuse polaire. La mesure de l'hydrophobicité (relative) de la paroi bactérienne est la proportion des cellules liées à la phase organique, déterminée par la mesure de la diminution de l'absorbance de la phase aqueuse (Skvarlaet *al*, 2002).

La détermination de l'hydrophobicité des bactéries se fait par utilisation des solvants apolaires (décane, hexadécane, xylène, toluène...) et la présence de protéines résulte dans l'augmentation de l'affinité des bactéries à ces solvants (Olivier *et al*, 2007).

D'après les études de Lee et Yii (1996), il est permis de dire qu'une bactérie est hydrophobe quand ce pourcentage est supérieur à 50%, hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 20% et moyennement hydrophobe quand le pourcentage est entre ces deux valeurs.

Le pourcentage d'adhésion d'*Entérocooccus faecalis* à l'exadécane estimé par la méthode BATH est de 39,25%, donc notre souche est moyennement hydrophobe.

L'hydrophobicité d'une bactérie est due en grande partie à la présence des composés de surface de la bactérie, utiles à l'adhésion (Rosenberg et al., 1990).

Il est alors aisé de comprendre qu'une bactérie hydrophobe aura plus de facilité pour enlever le film d'eau la séparant de la surface à coloniser et qu'elle établira plus facilement contact avec cette surface, qu'une bactérie hydrophile, ce qui est en accord avec nos résultats, car l'adhésion maximale en milieu acide et minimale en milieu basique sont tous les deux élevée quelque soit le support (polystyrène ou verre), dans des conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose :

L'adhésion d'*Entérocooccus faecalis* sur le polystyrène en aérobiose; maximale (~26%) à pH acide (3,08) et minimale (~ 8%) a pH basique (9).

L'adhésion d'*Entérocooccus faecalis* sur le polystyrène en anaérobiose; maximale (~22%) à pH acide (3,08) et minimale (~6%) a pH basique (9).

L'adhésion d'*Entérocooccus.faecalis* sur le verre en anaérobiose; maximale (~20%) à pH acide (3,08) et minimale (~9%) a pH basique (9).

Même avec l'effet du pH basique qui a contribué à la diminution des taux d'adhésion sur les deux matériaux (polystyrène et verre) les taux d'adhésion restent encore élevés, comparativement à une étude ultérieure ou on a trouvé des taux d'adhésion sur le verre lavé à l'ozone d'une bactérie hydrophile (E. coli K12) de 0,01%.

Des études ont montré que les propriétés de surface des cellules microbiennes varient en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent (van Oss *et al.*, 1986 ; Bellon-Fontaine *et al.*, 1990 ; Bos *et al.*, 1999 ; Gallardo Moreno *et al.*, 2002 ; Hamadi *et al.*, 2004 ; Bayouhd *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, plus l'hydrophobicité des cellules bactériennes augmentent, plus l'adhésion devient importante. Quant aux interactions électrostatiques, les charges négatives (généralement mieux exprimées à basse force ionique) provoquent une diminution de l'adhésion (Neu, 1996 ; Jana, 2000).

Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne aux supports inertes (Jana *et al.*, 2000 ; Cappello *et al.*, 2006).

L'étude de Boutaleb (2007) a montré que l'adhésion de *P.aeruginosa* est largement supérieure à celle d'*E. coli*, ce qui est en accord avec les travaux de plusieurs auteurs qui ont observé que l'adhésion des bactéries hydrophobes est généralement supérieure à celle des bactéries hydrophiles (Bruinsima *et al.*, 2001 ; Gallardo-Moreno *et al.*, 2002 ; Bayoudh *et al.*, 2006). Gallardo-Moreno *et al.* (2002) ont observé que pour deux souches de *Candida parapsilosis* isolées du sang, l'adhésion était proportionnelle au caractère hydrophobe de la souche et qu'un changement de température qui contribue à augmenter ce caractère hydrophobe favorise encore l'adhésion. Une autre étude du même auteur sur *Entérocooccus faecalis* démontre que l'adhésion de cette bactérie est plus importante sur le silicone (hydrophobe) comparé au verre (hydrophile), cette adhésion étant potentialisée par un changement de la composition du milieu de culture qui induisait une augmentation du caractère hydrophobe des souches bactériennes. Bruinsma *et al.* (2001) montrent également que sur deux types de lentilles de contact, l'une présentant un caractère hydrophobe et l'autre hydrophile, une souche hydrophobe (*P. aeruginosa*) adhère mieux qu'une souche hydrophile (*Staphylococcus aureus*). De même, Bayoudh *et al.* (2006) ont observé que *Pseudomonas Stutzeri* (hydrophobe) adhère mieux que *Staphylococcus épidermes* (hydrophile) quel que soit l'hydrophobicité du support : hydrophobe (couche d'oxyde d'étain) ou hydrophile (verre), l'étude de Boutaleb a également montré que l'adhésion de *P. aeruginosa* relativement hydrophobe est 4 à 100 fois plus importante qu'*E. coli* qui présente un caractère hydrophile. De même, l'adhésion aux substrats hydrophobes est 2 à 10 fois plus importante que le verre qui présente un caractère hydrophile. Il est important de signaler ici que même l'adhésion d'*E. coli* est plus importante sur les supports hydrophobes que sur le verre.

Les résultats de notre étude sont en accord avec les résultats bibliographique, car on a montré que la bactérie *Eterococcus faecalis* moyennement hydrophobe possède une adhérence élevée que ce soit sur le support hydrophobe (polystyrène) ou bien sur un support hydrophile (verre). Cependant, cette tendance doit être considérée avec circonspection puisque quelques auteurs ont observé dans certains cas que l'adhésion des bactéries hydrophobes est plus importante sur les supports hydrophobes et celle des bactéries hydrophiles est plus importante sur les supports hydrophiles (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990). Ceci montre qu'il existe encore des controverses entre les différents auteurs à ce sujet, ce qui rend important de prendre en compte d'autres paramètres tels que les autres propriétés physico-chimiques des cellules bactériennes

et des surfaces colonisables (caractère acide-base et charge globale des cellules bactérienne), qui constituent les principaux facteurs contrôlant l'adhérence bactérienne initiale.

Vue l'importance du caractère hydrophobe, l'évolution de l'hydrophobicité en fonction des facteurs environnementaux telles : le pH, la force ionique, le milieu de culture, la température ont été le thème de nombreuses études.

Dans notre étude nous avons présenté quelques facteurs affectant la formation des biofilms tel que le pH et la force ionique.

Effet du pH sur l'adhésion; Les résultats de Boutaleb ont montré que l'hydrophobicité de *P. aeruginosa* est maximale (~25%) à pH acide (6,5) et basique (9,5) et présente un minimum à pH neutre (~10%). Quel que soit le pH, *E. coli* présente toujours un caractère hydrophile très marqué.

L'adhésion d'*Enterococcus faecalis* moyennement hydrophobe dans des tubes en polystyrène (Figure II – 6 et Figure II - 8) et dans des tubes en verre (Figure II – 10 et Figure II–12) montre une diminution des taux d'adhésion avec l'augmentation du pH, en allant des pH acide (3,08 et 5) en passant par le pH neutre (7,03) jusqu'au pH basique (9), ou le taux d'adhésion est maximal à pH acide (3,08) et minimal à pH basique (9), que ce soit sur le polystyrène ou sur le verre. On peut expliquer ça par le fait que, plus le pH; est acide, plus la bactérie est chargée positivement. Ainsi, les charges négatives de surface apparaissant progressivement au fur et à mesure que le pH s'élève, ce qui diminue l'hydrophobicité, et par conséquent l'adhésion.

En outre on pourrait dire que l'adhésion d'*Enterococcus faecalis* en fonction de l'évolution du pH est étroitement liée à l'hydrophobicité de la cellule, qui à son tour a été influencée par les variations des pH.

L'allure des courbes qui représentent l'évolution des taux d'adhésion d'*Enterococcus faecalis* pour le polystyrène et le verre dans les conditions d'aérobiose et d'anaérobiose, et pratiquement la même pour les pH (3.08, 5, 7.03, 9), cela révèle que la variation des pH a influencé les propriétés de la cellule bactérienne, qui ont joué un rôle dominant par rapport au support quel que soit sa nature.

Dans notre étude, il paraît possible d'accepter que les variations du pH ont influencé en premier degré l'hydrophobicité de la cellule bactérienne, ce qui est strictement en

accord avec la bibliographie, mais des compléments d'études seront indispensables pour confirmer, si le pH a infecté d'autres propriétés physico-chimiques tel que le caractère de Lewis acide-base de la surface d'*Enterococcus faecalis*.

La diminution de l'hydrophobicité lors du passage du pH acide (6,5) au pH neutre (7,5) (Boutaleb 2007). Les mêmes résultats ont été observés par Gaboriaud *et al.* (2006) avec la technique d'adhésion au polystyrène sur des bactéries Gram- comme *Shewanella putrefaciens* en passant d'un pH 4 à un pH 10 ; des effets similaires ont été observés par Hsu & Huang (2002) pour *Giardia cyst* et *Cryptosporidium oocysts* entre pH 2,4 et 11,1 par la technique.

Dans notre étude la diminution des taux d'adhésion à plusieurs intervals de pH; lors du passage du pH acide (3,08) au pH (5), puis lors du passage du pH acide (5) au pH neutre (7,03), et enfin le même effet a été observé entre pH 7,03 et 9.

A la lumière de ces résultats, on pourrait accepter que le changement du pH ait infecté l'hydrophobicité, parce que l'interprétation de nos résultats en fonction de l'hydrophobicité est en accords avec la bibliographie.

Effet du CaCl₂ sur l'adhésion ; L'effet de la force ionique sur l'évolution du caractère hydrophobe a été aussi étudié. Quelques études ont montré une réponse spécifique à chaque bactérie.

P. aeruginosa présentait un caractère hydrophile aux 3 forces ioniques testées ce caractère diminue considérablement lorsque la concentration saline augmente de 5 à 75 mM en NaCl. Quant à *E. coli* elle présente un caractère hydrophile encore plus marqué que *P. aeruginosa* et paraît être moins sensible à la variation de la force ionique (Boutaleb 2007)

A force ionique élevée, l'adhésion entre les bactéries est favorisée au détriment des interactions bactérie-support (Boutaleb 2007), Cela peut favoriser la formation de floccs bactériens dont la cohésion peut être renforcée par la sécrétion d'une matrice exocellulaire. D'autre part, il est évident qu'une augmentation de la force ionique provoque une réduction des interactions électrostatiques répulsives par masquage des charges négatives prédominantes. Ceci doit donc naturellement favoriser l'adhésion, alors que c'est l'effet inverse qui est observé. Cela doit certainement être dû aux effets des interactions électrostatiques, le même effet et observé dans notre cas

Quant aux interactions électrostatiques, les charges négatives (généralement mieux exprimées à basse force ionique) provoquent une diminution de l'adhésion (Neu, 1996 ; Jana, 2000).

Selon la théorie DLVO, les ions monovalents (Na^+ , K^+) bivalent (Ca^{++} , Mg^{++}) ou trivalents (Al^{+++}) augmente la chance de voir une bactérie adhérente à la surface, dans une étude ultérieure, l'adhésion dans le milieu de suspension (PBS) qui contient les cations monovalent (K^+ , Na^+), a montré l'inverse, car il y a moins d'adhésion en présence de ces ions. Selon (Kretzschmar *et al.*, 1999) dans la grande majorité des études, le taux de remobilisation des particules augmente, tant que le système est dominé par des ions monovalents. On dit que les ions monovalents poussent la bactérie en solution.

La présente étude a également révélé l'abaissement des taux d'adhésions, en présence d'ions bivalent (Ca^{++}), donc il y a toujours des controverse, et la généralisation d'une telle théorie indépendamment de la souche bactérienne n'est pas possible,

Pour conclure il faut noter qu'il est maintenant reconnu dans la littérature que les protéines de surface des bactéries interviennent dans l'adhésion aux supports solides, notamment les surfaces métalliques. Ainsi, Pradier et ses collaborateurs (Pradier *et al.*, 2005) ont récemment montré que, parmi trois souches de bactéries à Gram négatif marines (DA, D41 et DO1), c'est la souche dont la surface est la plus riche en protéines (D41) qui adhère le plus à l'acier, mais aussi au verre et au téflon en quantité deux fois plus élevée que les autres souches. (Flint *et al.* 1997) ont mis en évidence qu'un traitement par du lysozyme ou de l'acide trichloroacétique, destiné à éliminer les polysaccharides en surface des streptocoques, n'a aucune conséquence sur l'adhésion bactérienne sur acier inoxydable. En revanche, le « clivage » des protéines de surface, par une action de la trypsine ou du sodium dodécylsulfate (SDS), réduit d'un facteur 100 le nombre de bactéries adhérentes.

L'analyse de la surface bactérienne peut considérablement contribuer à élucider le rôle des protéines pour l'initiation du biofilm, ainsi on peut recourir à la spectroscopie infrarouge (IR).

Conclusion

Cette étude a permis de souligner quelques paramètres qui influencent la bioadhésion. La bioadhésion a été étudiée sur deux supports : le polystyrène et le verre à travers l'utilisation du modèle biologique *Enterococcus faecalis* (relativement hydrophobe)

Nous avons noté durant cette étude que l'adhésion aux substrats hydrophobes (supports en polystyrène) était importante comparée au support hydrophile de référence (le verre) et également l'adhésion d'une bactérie hydrophobe est plus importante qu'une bactérie hydrophile ce qui est en accord avec les résultats des travaux antérieurs.

Par ailleurs l'expérience a révélé qu'une surface utilisée du verre devient plus susceptible à l'adhésion, car les taux d'adhésion sur le verre utilisée dépasse même les taux d'adhésion sur le polystyrène, cela suscitait la curiosité, et un test de l'hydrophobicité de la souche a été fait, la souche est alors moyennement hydrophobe, donc La surface du verre a changé de propriété, suite à son utilisation, et est devenue hydrophobe.

Une expérience sur le verre neuf était suffisante pour affirmer notre conclusion.

L'influence des variations du pH sur la bioadhésion d'*Enterococcus faecalis* est principalement due à l'influence du pH sur l'hydrophobicité de la souche bactérienne, Enfin, 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 prises en compte dans l'approche prédictive.

L'influence de la salinité paraît être importante, car une diminution considérable des taux d'adhésion a été observée après l'ajout du CaCl_2 à différentes concentrations.

Références bibliographiques

Apilanez I., Gutiérrez A. and Diaz M. 1998. Effect of surface materials on initial biofilm development. *Bioresource Technology*. **66**: 225-230.

Bergmaier, D., Lacroix, C., Macedo, M. G., et Champagne, C. (2001). « New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells ». *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 57, p. 401-406.

Block J.C., Sibille 1., Gatel D., Reasoner D.J., Lyking B., Clarck R.M., 1997. Biodiversity in drinking water distribution systems: a review. Proceedings of the specialized conference on 'The microbiologically quality of water', IWSA and FBA, London, pp.63-70.

Borsodi A.K., Farkas I and Kurdi P. 1998. Numerical analysis of planktonic and reed biofilm bacterial communities of lakeFertő. *Wat. Res.* **32**: 1831-1840.

Boulangé-Petermann, L., Rault, J., and Bellon-Fontaine, M.N. (1997). Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* 11, 201-216.

Brown, D., Beveridge, T., Keevil, C., et Sherriff, B. (1998). « Evaluation of microscopic techniques to observe iron precipitation in a natural microbial biolm ». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 26, p. 297-310.

Bryers J.D., 1987 .Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms, *Biotechnol. Progress.* **3**(2) 57-68.

Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W., de Jong, H.P., and Arends, J. (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 48, 980-983.

Cerning, J., Renard, C., Thibault, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., et Topisirovic, L. (1994). « Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*CG11 and partial structure analysis of the polymer ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, p. 3914-3919.

Champagne C.P., Lacroix C., Sodini-Gallot I. 1994. Immobilized cell technology for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**: 109-134.

Clausen, EM, BL Green and W Litsky (1977) Fecal streptococci: indicators of pollution. Dans: Hoadley, AW et BJ Dutka, édit., *Bacterial Indicators/Health hazards associated with water*. American Society for Testing and Materials, ASTM STP 635, pp.: 247-264.

Costerton J.W. and Lappin-Scott H.M. 1989. Behavior of bacteria in biofilms. *ASM News*. **55**: 650-654.

Costerton J.W. and Lewandowski Z. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiology*. **49**: 711-745.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science* ; 284 : 1318-22.

Costerton J.W. 1999. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **11**: 217-221.

Costerton J.W. 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *TRENDS in Microbiology*. **9**: 50-52.

Davies, D. G. 2000. « Physiological events in biolm formation ». Dans *SGM Symposium* 59, p. 37.52.

Davies, D. G. 2004. « Microbiology, bacterial physiology, biolm research ».
». <http://biology.binghamton.edu/davies/>.

Davis, C. Birss, V. D.cramb, Electrochemical characterisation of biofilm growth on platinum surfaces, in: 204 th Meeting of the electrochemical

De swaaf, M., Grobber, G., Eggink, G., De rijk, T., Van der meer, P., et Sijtsma, L. (2001). « Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptocodiumcohnii* ». *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 57, p. 395.400.

Déziel E, Comeau Y, Villemur R. 2001. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilitie. *J Bacteriol* ; 183 : 1195-204.

Debye, P. (1920). *Physik Z* 21, 178.

Derjaguin, B., and Landau, L. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *ActaPhysiochim* 14, 733-762.

Drenkard, E.Ausubel, F.M. *Nature* 2002. *Pseudomonas* bio film formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. 416, 740-743.

Dufrêne, Y.F., Boonaert, C.J.P., and Rouxhet, P.G. (1996) .Adhesion Didi Raoult - Dictionnaire de maladies infectieuses (1998) Elsevier Paris Edition scientifique et médicale, P 365.. BBiointerfaces, 7 , 113-128

Di Martino P., Cafferini N., Joly B. and Darfeuille-Michaud A. 2003. Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*.**154**: 9-16.

Dune, W.M. Rev.2002. Bacterialsadhesion.: seen any good biofilms lately ? ClinMicrobiol., 15, 155-166.

Elimelech, M., Gregory, J., Jia, X., and Williams, R. (1995). Particle Deposition and Aggregation: Measurement, Modelling and Simulation. (Oxford: Butterworth-Heinemann).

Flemming, H.-C.(1993). « Biolms and environmental protection ». *WaterScience and Technology*, vol. 27, no7-8, p. 1.10.

Fletcher M. 1980. Adherence of microorganisms to smooth surfaces. In Bact. Adher., ed E.H. Beachy. Chapman and Hall, London.

Filloux A; Chemin J.Aiguier; Vallet.I. 2003.M/S : médecine sciences Volume 19, numéro 1, Janvier 2003 Éditeurs : SRMS: Société de la revue médecine/sciences et Éditions EDK Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne,

Fletcher, M. (2001).« Biofilms ».Encyclopedia of life sciences.
<http://www.els.net>.

Flett, W. F., Osman, S. F., et Dunn, M. F. (1989). « Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated *fluorescent Pseudomonads* ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 55, no3, p. 579.583.

Flemming, H.-C.(1993). « Biolms and environmental protection ». *WaterScience and Technology*, vol. 27, no7-8, p. 1.10.

Garett ES, Perlegas D, Wozniak, DJ. Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). J Bacteriol 1999 ; 181: 7401-4

Geesey G.G., Richardson W.T., Yeomans H.G., Irvin R.T. and Costerton J.W. 1977. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can. J. Microbiol.***23**: 1733-1736.

Gharacklis, W.G. Mashall, K.C. 1990. (Eds); Biofilms, John Wiley and Sons Inc., New York,

Gibson, Jr E.K., McKay D.S., Thomas-Keprta K.L., Wentworth S.J., Westall F., Steele A., Romanek C.S., Bell M.S. and Toporski J. 2001. Life on Mars: evaluation of the evidence within martian meteorites ALH84001, Nakhla and Shergotty. *Precambrian Research*.**106**: 15-34.

Gleeson, C. et N. Gray (1997) *The coliform index and waterborne disease*. E & FN Spon, P 194 .

Groboillot A., Boadi D.K., Poncelet D. and Neufeld R.J. 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**: 75-107.

Habash M. Reld, G.J. Microbiol biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *J. Clin. Pharmacol.* 1999, 39, 887, -898.

Huang J., Lacroix C., Daba H. and Simard R. 1996. Pediocin 5 production and plasmid stability during continuous free and immobilized cell cultures of *Pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* **80**: 635-644.

Jenkinson H.F. and Lappin-Scott H.M. 2001. Biofilms adhere to stay. *TRENDS in Microbiology*.**9**: 009-010.

Kadurugamuwa J.L. and Beveridge T.J. 1995. Virulence factor are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *Journal of bacteriology*.**177**: 3998-4008.

Karel S.F., Libicki B. and Robertson C.R. 1985. The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem. Eng. Sci.***40**: 1321-1354.

Keesom, W.H. (1921). Physik. Z 22, 129.

Lappin-Scott, H.M. Costerton J.W. 1995. (Eds.) *Microbiol Biofilm*, Cambridge University Press,

Leenars, A.F.M. (1988). A new approach to the removal of sub-micron particles on surfaces, detection, adhesion and removal, K.L. Mittal, ed (New York: Plenum press), pp. 361-372.

Leenars, A.F.M., and O'Brien, S.B.G. (1989). Particle removal from silicon substrates using surface tension force. *Philips J Res* 44, 183-209.

London, F. (1930). Physik Z 63, 245.

Mah T.-F. C. and O'Toole G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology*.**9**: 34-39.

Marshall, K.C. (1985).Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In Bacterial adhesion : mechanisms and physiological significance, D.C. Savage and M.Fletcher, eds (New York: Plenum Press), pp. 133-161.

Mouton C., Bilak R., Michăilescu P. and Valcarcel J. 1999. Les biofilms bactériens de la cavité buccale. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **14**: 112-120.

O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *MolMicrobiol* ; 30 : 295-304.

O'Toole G.A., Gibbs K.A., Hager P.W., Phibbs P.V. and Kolter R. 2000. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*.**182**: 425-431.

O'Toole G.A., Kaplan H.B. and Kolter R. 2000.Biofilm formation as microbial development.*Annu. Rev. Microbiology*.**54**: 49-79.

Pedersen, S, S, lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol Scand.* 1992, Supp 28,

Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* ; 30 : 285-93.

Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, et al. 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol*; 183 : 7213-23.

PR-COMPANY GMBH 2004. « EinHerstelleraus Brandenburgbekämpfterfolgreichgefährliche Bakterienim Trinkwasser ». <http://www.baupresse24.de.00>, 1-79.

Pulcini, E. D. L. (2001). « Bacterial biofilms: a review of current research ». *Nephrologie*, vol. 8, p. 439.441.

Parsek MR, Greenberg EP. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria : a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *ProcNatlAcadSciUSA* ; 97 : 8789-93.

Ramage, G., VandeWalle, K., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. (2001). Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms.*Antimicrob Agents Chemother* 45, 2475-2479.

Rittmann, B. (1993). « The significance of biofilms in porous media ». *Water Resources Research*, vol. 29, no7, p. 2195.2202.

- Roques C.** 2000. Biofilms bactériens. Précis de biologie clinique, 391-405.
- Sauer FG, Barnhart M, Choudhury D, Knight SD, Waksman G, Hultgren SJ.** 2000. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr Opin Struct Biol* ; 10 : 548-56.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W. and Davies D.G.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*. **184**: 1140-1154.
- Semmler A.B., Whitchurch C.B., Mattick J.S.** 1999. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **145**: 2863-2873.
- Stewart P.S.** 2001. Multicellular resistance: biofilms. *TRENDS in Microbiology*. **9**: 204.
- Stickler D.** 1999. Biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. **2**: 270-275.
- Strathmann, M., Wingender, J., et Flemming, H.-C.** (2001). « Examination of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using lectin assays ». VAAM annual meeting.
- Sutherland, I.W.** (1998). « Novel and established applications of microbial polysaccharides ». *Tibtech Reviews*, vol. 16, p. 41-46.
- Sutherland, I.** (1982). « Biosynthesis of microbial exopolysaccharides ». *Advances in Microbial Physiology*, p. 80-150.
- Sutherland I.W.** 2001 The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS in Microbiology*. **9**: 222-227.
- Thorseth I.H., Torsvik T., Torsvik V., Daae F.L. and Pedersen R.B.** 2002. Diversity of life in ocean floor basalt. *Earth and Planetary Science Letters*. **6035**: 001-007.
- Trulear M.G. and Characklis W.G.** 1982. Dynamics of biofilm processes. *J. WPCF*. **54**: 1288-1301.
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A.** 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa* : identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 98 : 6911-6.
- Wall D, Kaiser D.** Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 1999; 32: 1-10.
- Van loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., et Zehnder, A.J. B.** (1990). « Influence of interfaces on microbial activity ». *Microbiological Reviews*, vol. 54, no1, p. 75-87.

Van elsas, J. D., Trevors, J. T., et Wellington, E. M. (1997).*Modern soilmicrobiology.* Marcel Dekker.

van Oss, C.J. (1996).Forces interfaciales en milieu aqueux. (Paris: Masson).

van Oss, C.J., Good, R.J., and Chaudhury, M.K. (1986). The Role of van der Waals Forces and Hydrogen Bonds in Hydrophobic Interactions Between Biopolymers and Low Energy Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 378.

Verwey, E.J.W., and Overbeek, J.T.G. (1948).Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. (New York: Elsevier).

Visser, J. (1976).Adhesion of colloïdal particles. In Surface Marijevic, ed (New York: John Wiley and Sons), pp. 3-84.

Whiteley M., Lee K.M. and Greenberg E.P. 1999.Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*.*Proceedings of the NationalAcademy of Science of the USA.***96:** 13904-13909.

Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, et al. Nature 2001.Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001 ; 413 : 860-4.

Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C. and Mattick J.S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.***295:** 1487.

Wuertz, S., Spaeth, R., Hinderberger, A., Griebe, T., Flemming, H.-C., et Wilderer, P. (2001). « A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals ». *Water Science and Technology*, vol. 43, no6, p. 25.31.

Zhang, X., Bishop, P. L., et Kupferle, M. J. (1998). « Measurement of polysaccharides and proteins in biofillm extracellular polymers ». *Water Science and Technology*, vol. 37, no4-5, p. 345.348.

Zhang, T. et Fang, H. (2001). « Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy ». *Biotechnology Letters*, vol. 23, p. 405.409.

Zobell C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity.*J. of Bacteriology.* 46: 39-56.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude de l'adhésion de la bactérie *Enterococcus faecalis*. Notre souche a été isolée à partir d'un prélèvement de dents monoradiculées, atteintes de gangrène pulpaire.

L'adhésion d'*Enterococcus-faecalis* a été étudiée dans des conditions d'aérobiose et d'anaérobioses, sur deux matériaux ; le verre et le polystyrène.

Puis on a étudié l'influence de l'acidité du milieu de suspension sur la quantité des bactéries qui adhèrent; on a travaillé dans des milieux de suspension : acide, neutre et basique.

L'effet de la force ionique a été également étudié, ou on a travaillé à différentes concentrations de CaCl_2 .

La quantification des bactéries adhérees a été faite par la méthode du cristal violet.

En effet Le calcul de l'hydrophobicité de notre souche a été calculé par la méthode MATHS.

Cette étude a montré une diminution de l'adhésion en partant du milieu acide au milieu basique en passant par le milieu neutre que ce soit sur le verre ou bien sur le polystyrène, dans des conditions d'aérobioses ou d'anaérobioses, sachant que la croissance de la bactérie croît avec l'augmentation des pH.

L'abaissement des taux d'adhésion avec l'augmentation des pH après interprétation comparative avec la bibliographie, est dû à l'effet du pH sur l'abaissement l'hydrophobicité des cellules bactériennes.

La présence des ions bivalents Ca^{++} dans la solution a engendré une diminution importante des taux d'adhésion.

Mots clés: Biofilm, Bioadhésion, *Enterococcus-faecalis*, hydrophobicité, réseaux de distribution, d'eau potable. Propriété de surface.

Abstract

This work is devoted to the study of adhesion of the *Enterococcus faecalis* bacterium. Our stock was isolated from teeth, attacked of pulpar gangrene.

The adhesion of *Enterococcus faecalis* was studied under conditions of aerobiose and anaérobiose, on two materials; glass and polystyrene.

Then we studied influence acidity of the medium of suspension on the quantity of the bacteria which adhere. We worked in mediums of suspension: acid, neutral and basic.

The effect of the ionic force was also studied; we worked with various concentrations of CaCl_2 .

The quantification of the adhered bacteria was made by the method of the purple crystal.

The hydrophobicity of microorganism was calculated by adhesion to solvents (MATS).

This study showed a reduction in adhesion from the acid medium to the basic medium while passing by the neutral medium, that it is on glass or of course polystyrene, under conditions of aerobioses or anaerobioses, knowing that the growth of the bacterium believes with the increase in the pH.

The lowering of the rates of adhesion with the increase in the pH after comparative interpretation with the bibliography is due to the effect of the pH on lowering the hydrophobicity of the bacterial cells.

The presence of the bivalent ions Ca^{++} in the solution generated a major reduction in the rates of adhesion.

Key words: Biofilm, Bioadhesion, *Enterococcus faecalis*, hydrophobicity, distribution networks, d' drinking water. Property of surface.

ملخص

هذا العمل مخصص لدراسة التصاق البكتيريا المعوية البرازية بالسطوح، وقد تم عزل البكتيريا من أسنان أحادية الجذر مصابة بالغرغرينا. لقد درسنا التصاق البكتيريا المعوية البرازية، في ظل ظروف هوائية ولاهوائية، على اثنين من المواد: الزجاج، والبوليسترين. ثم تمت دراسة تأثير حموضة الوسط على كمية البكتيريا التي تعلق، وقد عملنا في وسط حمضي، ووسط متعادل، ووسط قاعدي. وقد درسنا أيضا تأثير القوة الأيونية، واجرينا التجارب باستعمال تراكيز مختلفة من $CaCl_2$. أما تقدير كمية البكتيريا التي تعلق فقد اعتمدنا على طريقة الكريستال الأرجوان. ولقد لجانا الى طريقة الاعتلاق بالمحاليل لحساب التنافر المائي وأظهرت هذه الدراسة انخفاضا في الالتصاق على أساس من وسائل الإعلام حامض على المدى المتوسط فيحين الأساسية مرورا المتوسطة محايد أنه على الزجاج أو من البوليسترين بطبيعة الحال، في ظل ظروف هوائية ولاهوائية. علما بأن نمو البكتيريا وتعتد مع الزيادة في الرقم الهيدروجيني. تخفيض معدلات التصاق مع الزيادة في الرقم الهيدروجيني بعد تفسير مقارن مع المراجع، ويرجع ذلك إلى تأثير درجة الحموضة على خفض التنافر المائي من الخلايا البكتيرية. ولدت من وجود أيونات الكالسيوم ثنائي التكافؤ Ca^{2+} في حل انخفاض كبير في معدلات الإلتصاق.

الكلمات المفاتيح: بيوفيلم، الالتحام البكتيري، التنافر المائي، شبكات توزيع مياه الشرب، خصائص السطوح.