



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

L'influence des propriétés physicochimiques sur l'adhésion bactérienne.

Présenté et soutenu par : ZIAD Yousra

Le : 19/06/2016

HAYOUN Khadidja

Jury d'évaluation :

Président du jury : MERGOUD Lilia (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Examineur : ABDELAZIZ Ouided (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

Avant tout, nous remercions notre créateur « Allah » tout puissant qui nous avoir, donné la force, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail et arriver à ce stade scientifique.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mlle BOUHLOUKH Warda**, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre **préparation de ce mémoire.***

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

***Mme MERGOUD Lilia** pour avoir accepté de présider notre jury et consacré de son temps à la lecture de notre mémoire pour y apporter les meilleurs perfectionnements.*

***A Mme ABDELAZIZ Wided** pour sa contribution à ce jury et pour avoir donné son appréciation sur le contenu de ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs et enseignants du **département de Microbiologie** de l'université des frères Mentouri Constantine, qui n'ont ménagé aucun effort pour nous avoir permis d'acquérir toutes ces connaissances durant les cinq ans de notre formation.*

Nous ne saurons terminer sans remercier également tous les membres du service bactériologie au CHU Ben Badis de Constantine, notamment :

*Le **Pr .BENLABED Kadour** le chef du service, **Mme karima** la surveillante médicale , Les paroles ne suffisent pas pour remercier **Mme lamour meriem** Médecin microbiologiste et **Mme manel** Technicienne au CHUC , pour leurs aides et conseils et pour nous avoir facilitée l'accès au laboratoire et la réalisation de ce travail.*

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à toutes

Les personnes qui auront contribué de près ou

De loin à l'élaboration de ce mémoire.

Merci à toutes et à tous.

Dédicaces

*Je commence ma dédicace au nom du dieu et le salut sur Mohamed le
messager de dieu.*

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

*Toi **MA MÈRE Naïma**, l'être chère dans ma vie, toi qui est toujours là
à me consoler, me soulager et m'encourager, toi qui donner le précieux
de toi pour me voir réussir de jour en jour, **MÈRE** tu es
« La cause de ma réussite dans la vie »*

*L'être que j'aime tant, toi **MON PÈRE Kamel** la source à laquelle j'ai
toujours puisé patience et courage. Vos conseils, Vos directives,
« Toi **PÈRE** la lueur de mon chemin »*

*A ma grande mère **Zohra**.*

*A mes chères soeurs **Ikhllass** et **Kaouther**, et*

*A l'unique frère que j'ai au monde (**Nadir**), que dieu les protège.*

A mes tantes et à mes oncles.

A chaque cousins et cousines.

*A tous qui prennent le nom **ZIAD** et **CHETTAB**.*

A toutes mes copines et surtout

Zahwa, Marwa, Khadija, Sara, Assia, khawla, Soumia, Houda, Afef, Safa...

A tous mes professeurs.

A tout ma promotion de master Microbiologie.

*Spécialement à mon binôme et ma partenaire dans ce Mémoire :
Khadija qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.*

A tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin.

YOUSRA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.

A mes cher parents ; symboles de sacrifice, de tendresse d'amour. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mes chers frères :didine.youssef zakaria .abdelmaleke. Oussama

A mes très chère amies.

A tous ma famille maternelle et paternelle.

A tous ce qui me sont chers et A toutes les personnes qui j'aime...

A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.

A Mon binôme yousra.

Khadidja

Sommaire

INTRODUCTION	1
Partie I. Synthèse bibliographique	3
CHAPITRE I:Généralités sur les biofilms	3
1. Historique.....	3
2. Définition.....	3
3. Les étapes du développement d'un biofilm.....	4
3.1. L'adhésion des cellules bactériennes à la surface.....	4
a) Mise en place d'un film conditionnant	4
b) L'adhérence réversible.....	5
c) L'adhérence irréversible.....	5
3.2. Le développement précoce du biofilm.....	5
3.3. La maturation du biofilm	5
3.4. Le détachement de bactéries.....	6
4. Composition et organisation.....	6
5. Le quorum sensing.....	7
6. Les domaines d'intervention des biofilms	7
6.1. Dans le domaine médical.....	7
6.1.1. Les infections dues aux biofilms	7
6.1.2. Biofilms et implants médicaux.....	9
6.1.3. Résistance des biofilms aux antibiotiques.....	10
6.1.4. Protection vis-à-vis du système immunitaire.....	10
6.2. Les biofilms représentent une source de problèmes industriels.....	11
6.3. Les biofilms positifs.....	11

CHAPITRE II : Facteurs favorisant la formation d'un biofilm	12
1. Caractéristiques de la surface.....	12
1.1. Géométrie de la surface.....	12
1.2. Rugosité de la surface du support.....	12
1.3. Propriétés physico-chimiques de la surface.....	13
1.4. Présence d'un film protéique sur la surface.....	13
2. Influence des conditions environnementales.....	13
2.1. Forces hydrodynamiques d'un flux.....	14
2.2. La température.....	14
2.3. Le pH.....	14
2.4. Composition du milieu.....	14
3. Influence des propriétés bactériennes.....	15
CHAPITRE III: Généralités sur <i>Proteus mirabilis</i>	16
1. Introduction.....	16
2. Définition.....	17
3. Habitat.....	17
4. Taxonomie.....	17
5. Caractères bactériologiques	18
5.1. Caractères morphologiques.....	18
5.2. Caractères cultureux	18
5.3. Caractères biochimiques et métaboliques.....	19
6. Caractères génomiques.....	19
7. Diagnostic différentiel.....	20
8. Pouvoir pathogène chez l'homme.....	20
9. Facteurs de Virulence.....	20
9.1. L'uréase.....	21

9.2. L'essaimage.....	21
10. Sensibilité aux antibiotiques	22
10.1. Résistance naturelle.....	22
10.2. Résistance acquise.....	22
11. Formation de biofilms cristallins par <i>P.mirabilis</i>	23
Partie II. Matériel et méthodes.....	25
1. Souches bactériennes.....	25
2. Traitement des échantillons.....	25
3. Isolement et identification de <i>P. mirabilis</i>	25
3.1. Isolement.....	25
3.2. Identification.....	26
3.2.1. Examen macroscopique.....	26
3.2.2. Examen microscopique.....	26
3.2.3. Galerie classique.....	26
3.2.4. Identification par la galerie API 20 E.....	27
4. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	28
5. Etude de la formation de biofilm chez <i>P. mirabilis</i>	29
6. Effet du pH sur l'adhésion de <i>P. mirabilis</i>	30
7. Détermination de l'hydrophobicité de <i>P. mirabilis</i>	30
Partie III. Résultats et discussion.....	31
1. Isolement et identification de <i>P.mirabilis</i>	31
2. La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.....	33
3. Effet du pH sur la formation des biofilms de <i>P. mirabilis</i>	34
3.1. Effet du pH sur la croissance des cellules planctoniques.....	34
3.2. Effet du pH sur l'adhésion des cellules sessiles.....	36

4. Relation entre antibiorésistance et formation des biofilms chez <i>P. mirabilis</i>	39
5. Influence de l'hydrophobicité de surface cellulaire sur l'adhésion de <i>P. mirabilis</i>	40
CONCLUSION	44
Référence bibliographiques	46

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

ADH : Arginine di hydrolase
ADN : Acide désoxyribonucléique
AI : Auto-Inducteur
ATB : Antibiotique
BCC : Bouillon Coeur Cerveau
BLSE : Bêta-lactamases à spectre étendu
BN : Bouillon Nutritif
CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute
CV : Cristal Violet
DO : Densité Optique
EPS : Exo polysaccharides
G+C% : Guanine + Cytosine %
GEL : Gélatinase
GN : Gélose Nutritive
H₂O₂ : Eau oxygénée
H₂S : Sulfure d'hydrogène
IgA : immunoglobuline A
LDC : Lysine décarboxylase
LPS : Lipo polysaccharides
MATS : Microbial Adhésion To Solvants
MEB : microscopie électronique à balayage
ODC : Ornithine décarboxylase
ONPG : Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside
PBS : phosphate buffered saline
QS : Quorum Sensing
R : Rough
S : Smooth
TSI : Triple Sugar Iron
VP : Vosges-Proskauer

Liste des figures

Figure 1. Les étapes de la formation d'un biofilm bactérien.....6

Figure 2. Photographies d'un biofilm sur une prothèse de corde vocale (A) et d'un biofilm formé dans un boîtier de stockage pour lentilles de contact (B).....8

Figure 3. Mécanismes de formation de biofilms sur une sonde urinaire lors d'une infection du tractus urinaire liée au port de la sonde.....9

Figure 4. Phénomène d'essaimage chez *P. mirabilis* caractérisé par des anneaux concentriques sur la surface de la gélose.....21

Figure 5. Micrographies en microscopie électronique de *P. mirabilis*.....22

Figure 6. Des coupes transversales des sondes urinaires colonisées par des cultures pures de *P. mirabilis*.....24

Figure 7. Nombre d'ATB correspondant à la résistance chez les souches de *P. mirabilis*.....34

Figure 8. Effet du pH sur la croissance des cellules planctoniques de *P. mirabilis*.....35

Figure 9. Effet du pH sur l'adhésion des cellules de *P. mirabilis* fixées sur polystyrène.....37

Figure 10. Formation du biofilm chez les souches de *P. mirabilis* à pH 7.....40

Figure 11. Pourcentages d'hydrophobicité de surface cellulaire de *P. mirabilis*.....41

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste partielle des infections humaines dues aux biofilms.....**8**

Tableau 2. Facteurs et propriétés impliqués dans la formation des biofilms.....**15**

Tableau 3. Caractéristiques des patients.....**25**

Tableau 4. Milieux constitutifs de la galerie classique.....**27**

Tableau 5. Les antibiotiques testés sur les souches de *P. mirabilis*.....**28**

Tableau 6. Les résultats d'isolement et d'identification de *P. mirabilis*.....**32**

Tableau 7. Les profils de sensibilités aux ATB des souches étudiées.....**33**

Introduction

Introduction

Pendant longtemps les bactéries ont été étudiées sous forme planctonique en culture liquide en tant que cellules libres, alors que paradoxalement dans la nature la majorité d'entre elles se trouvent sous forme du biofilm. Dans cette structure particulière, les microorganismes se développent en micro colonies adhérentes les unes aux autres et sur une surface solide **(Bellifa, 2014)**.

Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans le domaine médical et industriel **(Bellifa, 2014)**.

Proteus mirabilis constitue l'une des causes majeures des infections urinaires communautaires et nosocomiales. Cette bactérie est responsable des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à leur capacité à adhérer sur des surfaces abiotiques, telles que les implants médicaux, et à former un biofilm **(Stickler, 2009)**. Elles sont également responsables d'infections localisées surtout cutanées, d'infections des voies respiratoires, de septicémies et de bactériémies **(Archambaud et Clave, 2004)**.

D'après le Center for Disease Control and Prevention (CDC), 65 % des infections bactériennes sont dues à la présence des biofilms. En outre, les infections associées aux biofilms constituent un problème majeur en clinique et sont la cause de l'augmentation de la mortalité et du coût de traitement **(Liesse et Jean, 2012)**.

La mise en place d'un biofilm s'effectue en plusieurs étapes, l'adhésion est l'une des premières étapes. Elle est influencée par de nombreux facteurs qui peuvent être répartis en trois catégories : les caractéristiques des surfaces à coloniser, les conditions environnementales et les propriétés bactériennes **(Branger et al., 2007)**.

Le présent travail a pour objectif, dans un premier temps, de détecter la formation de biofilms chez divers isolats cliniques de *P. mirabilis*, en appliquant la méthode de coloration au cristal violet, qui est couramment décrite dans de nombreux travaux sur les biofilms.

Dans un deuxième temps, d'étudier les facteurs physico-chimiques qui peuvent influencer le processus d'adhésion tels que le pH du milieu environnant et l'hydrophobicité de la surface cellulaire.

Par ailleurs, l'étude des profils d'antibio-résistance des souches isolées a été effectuée en testant une gamme d'antibiotiques, les plus fréquemment prescrits lors des infections à *P. mirabilis*.

Partie I.
Synthèse
Bibliographique

CHAPITRE I: Généralités sur les biofilms

1. Historique

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

En 1932, Henerici observa des communautés bactériennes fixées sur des lames de verre placées dans un aquarium. Selon cet auteur, la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (**Trautner *et al.*, 2009**).

Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Zobell en 1943.

En 1978, **Costerton *et al.***, ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont proposé la théorie de «biofilms», qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent aux surfaces vivantes et inertes et les avantages accumulés par cette niche écologique (**Branger *et al.*, 2007 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Kara Terki, 2014**).

Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriel, environnementale et médicale. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (**Donlan, 2002**).

2. Définition

Le biofilm est un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes, qui forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de micro-colonies associées entre elles et à des surfaces biotiques ou abiotiques (**Myriam, 2012**).

L'adhérence de ces micro-organismes à une surface est marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice qui lie fortement le biofilm à cette surface (**Phillips *et al.*, 2010**).

Ces surfaces peuvent prendre plusieurs formes ; minérales (roche) ou organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surface alimentaires ou coques des navires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) (**Branger *et al.*, 2007 ; Bellifa, 2014**).

Le biofilm, structure dynamique en évolution constante, constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (**Espinasse *et al.*, 2010**).

3. Les étapes du développement d'un biofilm

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (**Annous *et al.*, 2009 ; Vu *et al.*, 2009**).

Le cycle de mise en place d'un biofilm sur une surface s'effectue généralement selon trois étapes majeures:

- L'adhésion des cellules bactériennes à la surface.
- La maturation du biofilm, qui correspond à la multiplication des cellules et la mise en place d'une architecture particulière avec production de la matrice d'exo-polymères.
- Le détachement cellulaire permettant la colonisation de nouvelles surfaces (**Marchal, 2010**).

Un biofilm peut être considéré comme un équilibre dynamique entre les phénomènes qui tendent à en augmenter l'épaisseur (multiplication des cellules qui le composent ou agrégation de nouveaux organismes planctoniques, en suspension) et les phénomènes qui tendent à en réduire l'épaisseur (mécanismes de détachement) (**Squinazi, 2013**).

3.1. L'adhésion des cellules bactériennes à la surface

L'étape d'adhésion peut être divisée en 3 sous-étapes :

a) Mise en place d'un film conditionnant

Les molécules, organiques ou inorganiques, présentes dans un milieu aqueux, sont attirées vers les surfaces et forment le film conditionnant qui semble nécessaire pour l'adhésion des bactéries sur une surface (**Palmer *et al.*, 2007**). Ce film peut être constitué de glycoprotéines, phosphoprotéines, albumines ou lipides. Il représente une source de nutriments non négligeable pour les bactéries favorisant ainsi leur chimiotactisme (**Squinazi, 2013**).

b) L'adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité et en présence d'un film conditionnant, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles) (**Hoiby *et al.*, 2011**).

Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher. Cette étape est influencée par des conditions environnementales. (**Branger *et al.*, 2007 ; Pecastaings, 2010; Muller et Guaguere, 2014**).

c) L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible et forte en raison de la production d'exopolysaccharides (EPS) par les bactéries et surtout grâce à les liaisons de type hydrophobe qui s'établie entre ces deux (**Branger *et al.*, 2007 ; Hoiby *et al.*, 2011 ; Bellifa, 2014**).

Dans un second temps les structures d'adhérence bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E. coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface, jouent un rôle important dans cette étape (**Beloin *et al.*, 2008**).

3.2. Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des EPS. Elles s'agrègent entre elles et forment des micro-colonies, qui sont protégées par la matrice EPS (**Jacobsen *et al.*, 2008**).

3.3. La maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les micro-colonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke *et al.*, 2006 ; Folkesson *et al.*, 2008**).

La production et la sécrétion d'enzymes provoque la dégradation des résidus présentent dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments qui favorise le grandissement et la croissance du biofilm jusqu'à devenir macroscopique (**Branger *et al.*, 2007 ;Jacolbsen *et al.*, 2008 ; Alnnasouri, 2010**).

3.4. Le détachement de bactéries

La dernière phase de la croissance du biofilm se poursuit par le phénomène de détachement. Il intervient seulement à la fin de croissance afin de modérer l'épaisseur du biofilm et les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (Kaplan, 2010).

Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries (Joshi *et al.*, 2010). Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Joshi *et al.*, 2010).

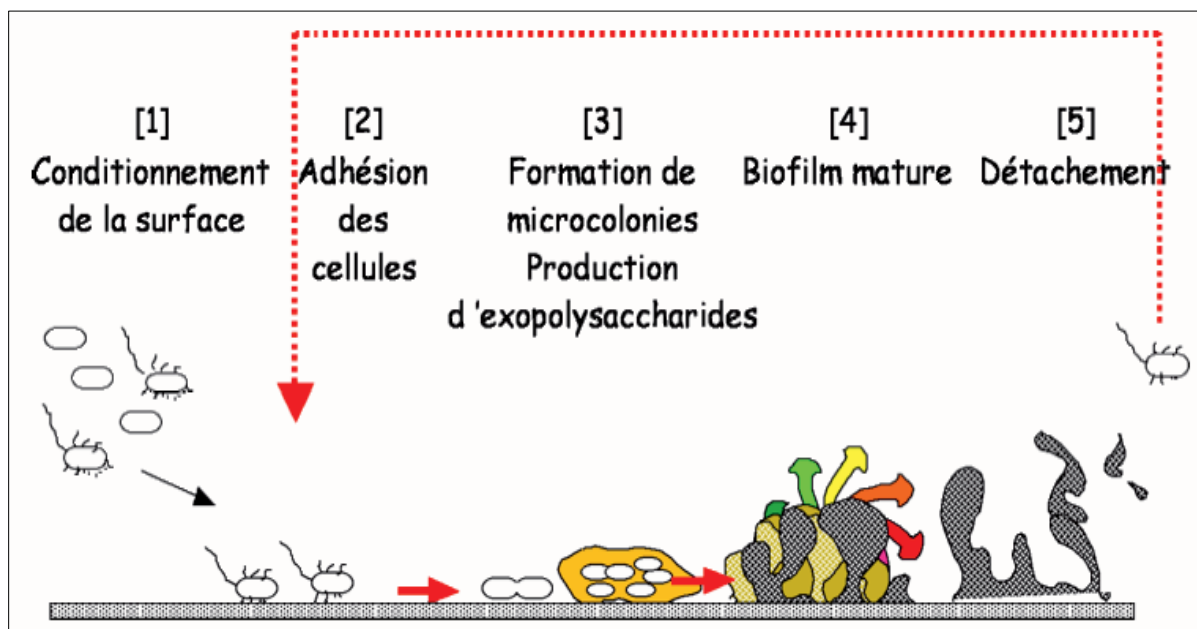


Figure 1. Les étapes de la formation d'un biofilm bactérien.

(Roux et Ghigo, 2006)

4. Composition et organisation

Un biofilm est approximativement constitué de 90% de matrice extracellulaire d'exopolymères et de 5% de microorganismes (Bellifa, 2014).

La matrice extracellulaire d'exo-polymères est principalement constituée d'eau (97%) et incluse également des polymères d'EPS, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. Cette matrice a un rôle structural et un rôle protecteur pour les cellules, limitant par exemple la pénétration de molécules antimicrobiennes (Beloin *et al.*, 2008).

5. Le quorum sensing

La densité des bactéries et leurs contacts cellulaires facilitent la communication intercellulaire via un mécanisme appelé le « Quorum sensing »(QS), qui implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signal appelées des auto-inducteurs (AI). Chez les bactéries à Gram négatif, l'AI est une homosérine lactone, alors que chez les bactéries à Gram positif, c'est un oligopeptide appelé phéromone **(Roux et Ghigo, 2006)**.

Le QS permet aux bactéries d'adopter un comportement spécifique à la vie en communauté, par régulation de leur expression génétique en réponse à la densité cellulaire via la production d'AI. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du QS dans la formation des biofilms **(Roux et Ghigo, 2006 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Pecastaings, 2010)**.

6. Les domaines d'intervention des biofilms

6.1. Dans le domaine médical

6.1.1. Les infections dues aux biofilms

Les biofilms sont responsables d'infections chroniques et posent de nombreux problèmes dans le domaine médical. Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes immunodéprimés et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* **(Costerton, Stewart et Greenberg, 1999)**. (Tableau 1).

Ces infections contribuent de manière très importante aux infections nosocomiales. En effet, les biofilms ont la capacité de se développer sur divers instruments médicaux: sondes urinaires, cathéters veineux, tubes de ventilation artificielle, prothèses orthopédiques, etc **(Roux et Ghigo, 2006 ; Klein, 2011)**. (Figure 2).

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

Infection ou maladie	Espèce(s) impliquée(s)
Caries dentaires	Cocci à Gram positif acidogènes (<i>Streptococcus spp.</i>).
Périodonties	Bactéries anaérobies orales, à Gram négatif.
Mucoviscidose pulmonaire	<i>P. aeruginosa</i> et <i>Burkholderia cepacia</i> .
Endocardites	<i>Streptococcus sp.</i> et <i>Staphylococcus spp.</i>
Ostéomyélites	Plusieurs espèces bactériennes et fongiques souvent mixés.
Infections de tractus biliaire	Bactéries Entériques (<i>Escherichia coli</i>).
Prostatites bactérienne	<i>Escherichia coli</i> et autres bactéries à Gram négatif.
Infection des lentilles de contact	<i>P. aeruginosa</i> et cocci à Gram positif.
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> .

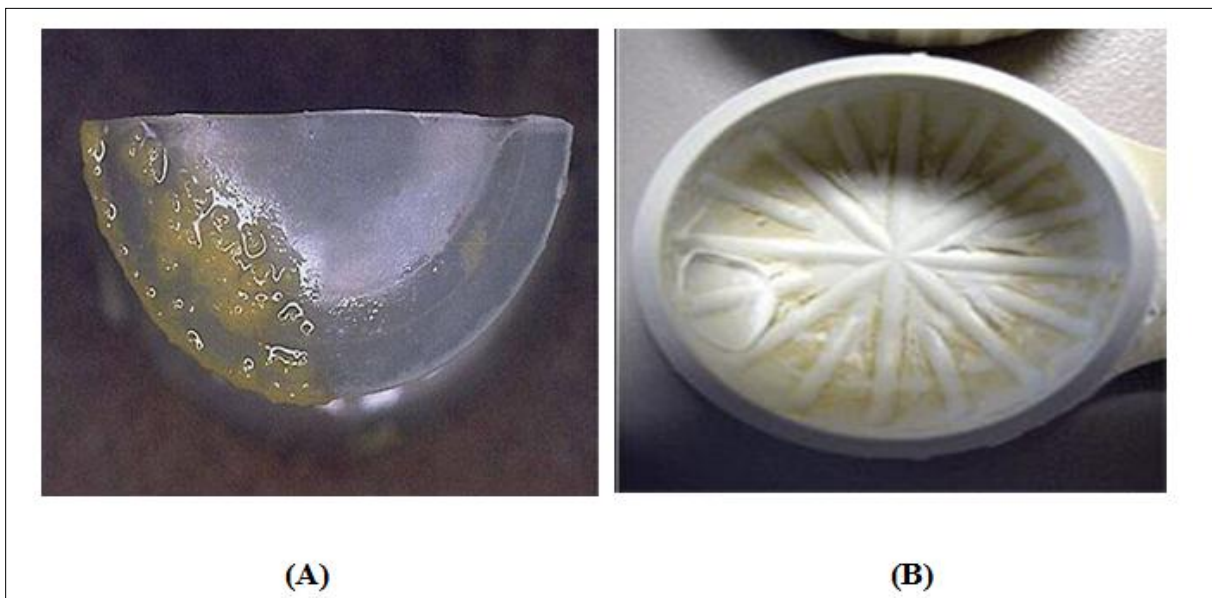


Figure 2. Photographies d'un biofilm sur une prothèse de corde vocale(A) et d'un biofilm formé dans un boîtier de stockage pour lentilles de contact(B) (Klein, 2011).

D'autre part, la contamination des systèmes de climatisation, de ventilation et de distribution d'eau par des biofilms abritant des microorganismes pathogènes, contribue à la propagation des infections en milieux hospitaliers ou non hospitaliers, mais également dans les environnements agroalimentaires où les biofilms sont une source importante de nuisance (Donlan et Costerton, 2002).

6.1.2. Biofilms et implants médicaux

82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés ; principalement par *Pseudomonas spp.*, des staphylocoques et des entérocoques . Ceci pose un véritable problème de santé publique pour les personnes nécessitant ces implants (**Chalvet de Rochemonteix, 2009**).

Les biofilms peuvent se former à la surface ou à l'intérieur de dispositifs médicaux implantés dans l'organisme tels que les lentilles de contact, les cathéters veineux centraux, les sondes endotrachéales, les dispositifs intra-utérins, les valves cardiaques artificielles et les sondes urinaires (**Figure 3**) (**Chalvet de Rochemonteix, 2009**).

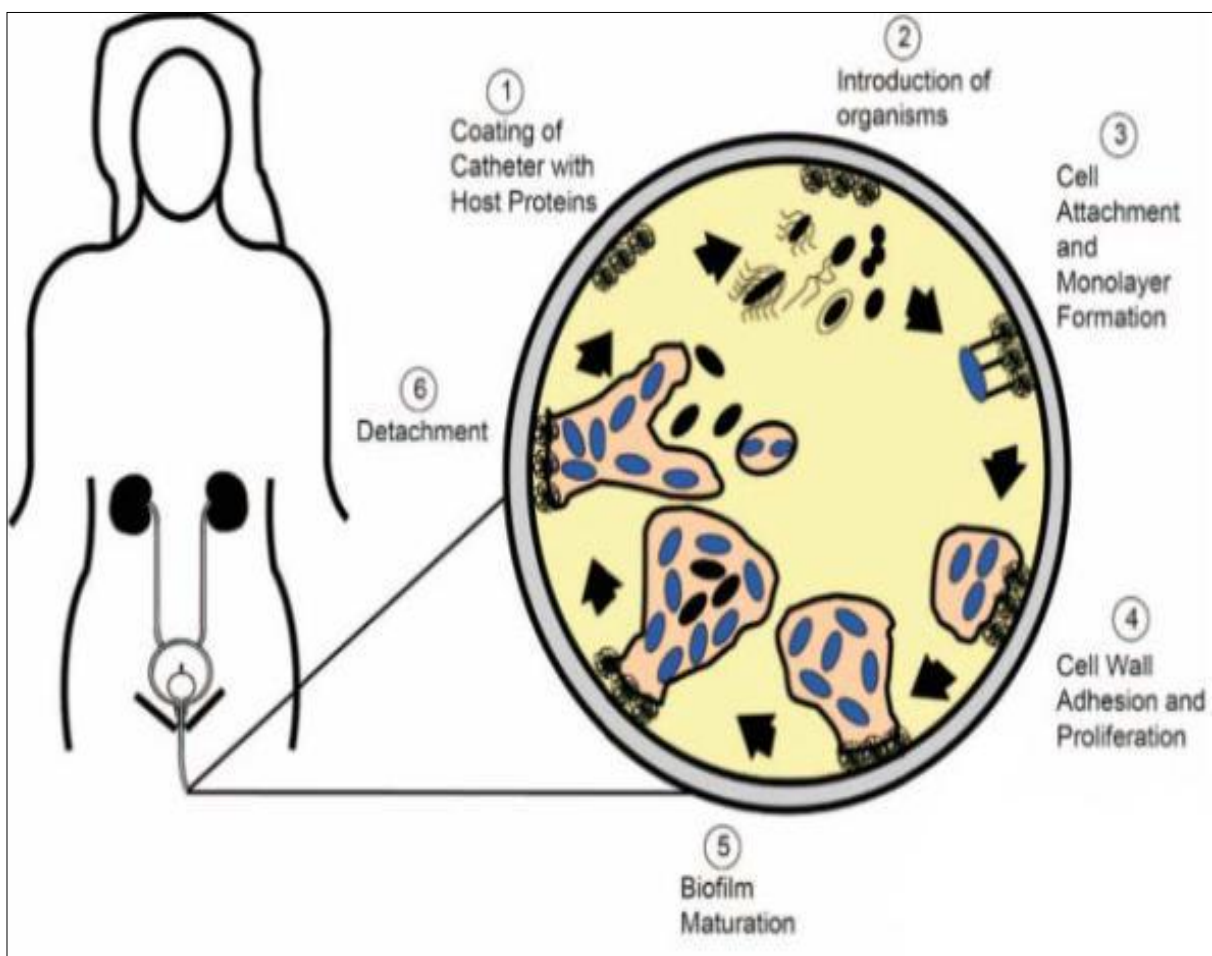


Figure 3. Mécanismes de formation de biofilms sur une sonde urinaire lors d'une infection du tractus urinaire liée au port de la sonde (**Jacobsen, 2008**).

La structure ovale grise au centre de la figure matérialise une sonde urinaire. Un film protéique, représenté par un alignement de disques noirs, se forme à la surface de la sonde (1).

Puis, des micro-organismes (éléments figurés en noirs) pénètrent dans l'organisme (2), se fixent à la surface de la sonde et forment un biofilm monocouche (3). Puis, les phases de croissance et de maturation du biofilm ont lieu (4) & (5), et enfin les bactéries se détachent et essaient à partir du biofilm (6).

6.1.3. Résistance des biofilms aux antibiotiques

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants) **(Roux et Ghigo, 2006)**.

Cette résistance accrue, multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.) ; elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus et cela est dû à la structure du biofilm qui facilite le transfert horizontal de gènes entre les bactéries, processus impliqué dans l'acquisition des gènes de résistance aux ATB **(Roux et Ghigo, 2006 ; Soussereau, 2013)**.

La résistance élevée des biofilms aux agents antibactériens pourrait également reposer sur la présence d'une sous-population de bactéries résistantes, capables de résister à de fortes concentrations d'ATB qui peuvent être 10 à 100 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique, mais ne permettent pas l'élimination complète ce qui provoque de nombreux problèmes en milieu médicale **(M'hamedi, 2015)**.

6.1.4. Protection vis-à-vis du système immunitaire

En plus de leur résistance accrue aux ATB, les biofilms sont protégés vis-à-vis du système immunitaire des hôtes infectés. **(M'hamedi, 2015)**.

La taille des biofilms est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose. Les cellules phagocytaires libèrent des enzymes qui ont très peu d'effet sur le biofilm et qui peuvent endommager les tissus **(Klein, 2011)**. La matrice extracellulaire est également une barrière au système immunitaire de l'hôte car elle empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps **(Roux et Ghigo, 2006)**.

6.2. Les biofilms représentent une source de problèmes industriels

Les biofilms posent également des problèmes dans de nombreux secteurs industriels. Par exemple la formation de biofilms dans les canalisations d'eau potable, en particulier par la bactérie *Legionella pneumophila*, est un problème majeur car l'ajout de chlore ne permet pas d'éliminer les bactéries fixées (**Roux et Ghigo, 2006 ;Alnnasouri, 2010**).

La formation également de biofilms sur les coques des navires, appelée phénomène de « biofouling », conduit à une augmentation des forces de friction, une diminution de la vitesse des bateaux et des surcoûts énergétiques considérables (**Roux et Ghigo, 2006**).

6.3. Les biofilms positifs

Les biofilms peuvent avoir des effets positifs est jouent aussi un rôle essentiel dans de nombreux processus :

- Les biofilms sont utilisés dans la production du vinaigre (acide acétique).
- Les réacteurs à biofilm ont également été utilisés dans la production d'ATB. Ex : la pénicilline.
- Les biofilms sont également utilisés pour le traitement biologique des eaux résiduaires.
- Ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux.
- D'autre part, la flore commensale humaine peut être considérée comme un biofilm qui protège son hôte contre les attaques des bactéries pathogènes (**Cohen, 2002**).

CHAPITRE II : Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs qui peuvent être répartis en trois catégories :

- Les caractéristiques des surfaces à coloniser.
- Les conditions environnementales.
- Les propriétés bactériennes (**Branger *et al.*, 2007**).

1. Caractéristiques de la surface

N'importe quelle surface en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm (**Chalvet de Rochemonteix, 2009**).

1.1. Géométrie de la surface

La géométrie de la surface externe du support, à savoir sa forme tridimensionnelle, sa porosité, ses irrégularités de surface, détermine la localisation de l'adhésion bactérienne. (**Campanac, 2002**).

Les bactéries colonisent préférentiellement les supports poreux et se regroupent en général au niveau des aspérités, des ruptures de courbure, des coins. L'accumulation des biofilms à la surface des supports se réalise de fait dans les zones où la circulation des fluides environnants est freinée par les frottements sur les parois (**Campanac, 2002**).

1.2. Rugosité de la surface du support

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micros-colonies est importante. Néanmoins, certaines souches bactériennes colonisent aussi des surfaces lisses (**Characklis, 1990 ; Donlan et Costerton, 2002**).

1.3. Propriétés physico-chimiques de la surface

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**).

1.4. Présence d'un film protéique sur la surface

La présence de polymères sur un support modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (**Nobbs, 2009**).

La nature de ces films protéiques est différente selon les milieux. Les bactéries formant le biofilm de la plaque dentaire se fixent sur un film protéique, présent à la surface de l'émail dentaire et composé de lysosymes, de glycoprotéines et de lipides (**Donlan, 2002**).

La présence de films protéiques sur des implants médicaux en contact direct avec un fluide favorisent la formation de biofilms. Par exemple, les cathéters veineux centraux, en contact direct avec le sang, sont recouverts de plaquettes, de plasma et de protéines: albumine, fibrinogène, ... (**Goller, 2008**).

2. Influence des conditions environnementales

Les facteurs environnementaux tels que la température, la concentration bactérienne, l'existence de flux, la qualité et la quantité des substances nutritives environnantes affectent l'adhésion bactérienne et la formation d'un éventuel biofilm. Ainsi, certaines souches bactériennes incapables de s'organiser en biofilm *in vivo*, peuvent présenter cette faculté *in vitro* dans des conditions expérimentales propices. De même, une souche bactérienne isolée à partir d'un biofilm développé à la surface d'un dispositif biomédical peut, *in vitro*, perdre cette propriété du fait de conditions expérimentales trop éloignées des conditions physiologiques (**Baillif et al., 2010**).

2.1. Forces hydrodynamiques d'un flux

Les forces hydrodynamiques sont considérées comme étant les facteurs environnementaux les plus susceptibles d'affecter l'adhésion bactérienne et le développement du biofilm bactérien (**Baillif *et al.*, 2010 ; Bellifa, 2014**).

En effet, la répartition bactérienne sur un support est modélisée par l'intensité d'un flux : si celui-ci est laminaire, les bactéries auront tendance à s'organiser en agrégats amorphes alors qu'en cas d'écoulement turbulent, elles auront plutôt tendance à adopter une disposition en fins serpents placés dans le sens du courant (**Baillif *et al.*, 2010**).

La production de slime est aussi modulée en fonction du débit : plus les forces d'écoulement sont élevées, plus le slime est abondant, épais et dense permettant une meilleure adhésion des bactéries au support et entre elles, ainsi qu'une meilleure protection mécanique. L'existence d'un courant à la surface d'un support lors de la phase d'adhésion initiale déterminera donc la robustesse de l'attachement bactérien au support (**Baillif *et al.*, 2010**).

2.2. La température

Elle est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes (**Dumas, 2007**).

2.3. Le pH

Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (**Hamadi *et al.*, 2004 ; Boutaleb, 2007**).

2.4. Composition du milieu

La composition du milieu nutritif, tant au niveau qualitatif que quantitatif, est capable de moduler l'adhésion bactérienne (**Bellifa, 2014**). Ainsi la présence de calcium et de magnésium semble faciliter l'adhésion réversible de la bactérie à un support. La synthèse du slime est favorisée par un excès de carbone, une addition de glucose, ou une déplétion en nitrogène, potassium et phosphate (**Baillif *et al.*, 2010**).

La concentration en nutriments joue un rôle majeur : un milieu riche en substrats favorise l'adhésion et la croissance bactériennes. En cas d'appauvrissement du milieu environnant les bactéries encore planctoniques auront tendance à être attirées par le biofilm qui représente alors une réserve en substrats (Bellifa, 2014).

3. Influence des propriétés bactériennes

Pour une surface donnée, l'adhésion bactérienne sera fonction de l'espèce bactérienne et même de la souche bactérienne utilisée du fait de caractéristiques physicochimiques différentes. Toute modification des caractéristiques de surface des microorganismes peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion bactérienne (Baillif *et al.*, 2010).

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'EPS influencent l'attachement des bactéries sur une surface (Donlan, 2002). (Tableau 2).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae et certaines protéines semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les EPS et les lipo-polysaccharides(LPS) sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002).

Tableau 2. Facteurs et propriétés impliqués dans la formation des biofilms (Chalvet de Rochemonteix, 2009)

Propriétés du support	Propriétés du milieu aqueux environnant	Propriétés des cellules
Texture, rugosité, présence d'aspérités	Vitesse du flux, présence d'un flux laminaire ou non	Hydrophobicité de la surface des cellules
Hydrophobicité	pH	Présence de fimbriae
Présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface	Température	Présence de flagelles
	*Cations (Ca ²⁺ , Na ²⁺ , Fe ³⁺ ...) *[Fer], [nutriments] *Sources de carbone disponibles *Disponibilité du milieu en Oxygène	Rôle des structures polymériques extracellulaires d'exopolysaccharides
	Présence d'agents antimicrobiens	

CHAPITRE III: Généralités sur *Proteus mirabilis*

1. Introduction

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant une forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par **Rahn en 1937** qu'il dénomma *Enterobacteriaceae* et dans lequel il rassembla les microorganismes présentant des propriétés biochimiques et morphologiques communes et parmi lesquels on trouvait déjà les genres tels qu'*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* et *Shigella* (**Joly et Reynaud, 2002**).

Ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux. Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif des entérobactéries pouvant proliférer en abondance dans l'environnement (sols et eaux) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques (**Joly et Reynaud, 2002**).

Les genres bactériens, qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, répondent à la définition suivante : bacilles à Gram négatif ; immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche ; aéro-anaérobies facultatifs ; se développant aisément sur milieu ordinaire ; fermentant le glucose ; ne possédant pas d'oxydase ; possédant une catalase (à l'exception de *Shigella dysenteriae*) ; réduisant les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi *Erwinia*). Le contenu en G+C% de leur ADN est : 39 à 59, ce qui permet de les différencier des *Pseudomonas* et des *Vibrionaceae* (**Willey et al., 2010**).

Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, le genre *Proteus* fait partie d'un groupe de bactéries appelé en bactériologie « **la tribu des Proteae** ». Il comporte les trois genres : *Proteus*, *Morganella*, et *Providencia*. Ces derniers sont les seules *Enterobacteriaceae* qui possèdent les enzymes désaminases du L-tryptophane ou de la L-phénylalanine (**Eleonora, 2012**).

Les *Proteus* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux, quoi qu'en petit nombre (**Eleonora, 2012**). Ils se trouvent généralement dans le sol, l'eau et les eaux usées. Elles sont des pathogènes opportunistes humains qui causent une variété de maladies

nosocomiales acquises et communautaires, y compris les infections des voies urinaires, les septicémies et les infections de plaies (**Drzwiecka, 2016**).

Le genre *Proteus* est actuellement composé de cinq espèces nommées ; *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus penneri* et *Proteus hauseri* et trois espèces génomiques ; *Proteus* genomospecies 4, 5 et 6 (**Drzwiecka, 2016**).

2. Définition

P. mirabilis a été décrit par **Hauser, en 1885**, qui a marqué sa nature d'essaimage et sa vitesse lente lors de la liquéfaction de la gélatine. Elle est appelée *mirabilis*, de la signification latine merveilleuse et surprenante, donc c'est un bacille spécial (**Stickler, 2009 ; Eleonora, 2012**).

P. mirabilis est une bactérie commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Elle n'est pas pathogène et provoque rarement une infection chez des individus en bonne santé (**Stickler, 2009**). Cette bactérie provoque 90 % des infections à *Proteus* (**Gus, 2015**).

3. Habitat

C'est une bactérie très répandue dans la nature et commensale de l'intestin de l'homme et des animaux (**Gus, 2015**).

Elle infecte de manière opportuniste les voies urinaires des personnes présentant des anomalies des voies urinaires et les patients exposés à un cathétérisme à long terme (**Mobleyand, 1987**). Cette bactérie se rencontre également dans l'environnement hospitalier au niveau de dispositifs médicaux tels que les cathéters, drains, sondes urinaires (**Holling, 2014**).

P. mirabilis peut être trouvé sous forme planctonique, mobile ou en biofilm (**Holling, 2014**).

4. Taxonomie

La classification de *P. mirabilis* a d'abord été fondée sur l'étude de leurs caractères phénotypiques (morphologiques, biochimiques...) puis sur leur caractères génotypiques, la composition en G+C % et qui est égale à 38-41% fût rajouté comme caractéristique génétique (**Singleton, 2004**).

Selon la 9^{ème} édition de **Bergey's manual of systematic bacteriology (2007)**: *P. mirabilis* est classée comme suit :

Règne :	<i>Bacteria</i>
Embranchement :	<i>Proteobacteria</i>
Classe :	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordre :	<i>Enterobacteriales</i>
Famille :	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre :	<i>Proteus</i>
Espèce :	<i>Proteus mirabilis</i> . (Willey et al., 2010).

5. Caractères bactériologiques

5.1. Caractères morphologiques

Les *Proteus spp.* Sont des bacilles à Gram négatif, dont les dimensions varient de 6 µm de long et 0,3 à 1 µm de large et un diamètre entre 0,4 à 0,8 µm. Ces dimensions varient suivant l'âge de la culture, l'espèce et la souche. Elles sont non sporulées et possèdent une capsule (Joly et Reynaud, 2002 ; Eleonora, 2012).

Les bactéries appartenant à l'espèce *P. mirabilis* sont caractérisées par leur extrême mobilité, dû à la présence de nombreux flagelles longs et courts, et leurs polymorphisme (Manos, 2006 ; Drzwiecka, 2016).

5.2. Caractères cultureux

La culture de *P. mirabilis* est rapide. Les colonies formées après 18 à 24 heures d'incubation à 35-37 °C sont bombées et rondes à bord net, leur surface est lisse et brillante, il s'agit des formes S « Smooth » (Joly et Reynaud, 2002).

Après repiquage en bouillon, la culture se traduit par un trouble homogène sur toute la hauteur du tube. Après plusieurs repiquages d'une souche en phase S, les colonies deviennent rugueuses, sèches, plates, leur contour est irrégulier, leur teinte mate, il s'agit des formes R « Rough ». En bouillon elles donnent une culture dont l'aspect est granuleux après agitation et

elles forment des agglutinats spontanés qui sédimentent, elles sont auto-agglutinables dans une suspension en eau salée (2 % de NaCl) (**Joly et Reynaud, 2002**).

Elle produit fréquemment un envahissement de la surface des milieux solides qui s'étend par vagues successives et peut gagner en 24 heures la totalité de la surface due à leur extrême mobilité qui est facilement décelable sur les milieux d'isolement, où elle se propage par ondes concentriques, formant un film recouvrant les bactéries potentiellement pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*). Ce phénomène est appelé essaimage (**Joly et Reynaud, 2002 ; Eleonora, 2012**).

P. mirabilis pousse bien sur milieux ordinaires à 37 °C. Elle donne des colonies grosses et produit une odeur très caractéristique de poisson pourri, non hémolytiques, envahissant la surface de la gélose au sang. Sur la gélose lactosée au pourpre de bromocrésol, les colonies sont petites, transparentes en 24 heures, lactose négatif, ne forment pas de nappe car le milieu ne contient pas d'NaCl (**Archambaud et Clave, 2004**).

5.3. Caractères biochimiques et métaboliques

Les bactéries du genre *Proteus* sont des aéro-anaérobies, oxydase négatif, catalase positif à métabolisme fermentatif. En ce qui concerne *P. mirabilis*, une réponse négative est obtenue pour les tests suivants : le lactose, l'ONPG, LDC, mannitol, indole, maltose, salicine et l'esculine, tandis que les tests : réduction des nitrates en nitrites, TDA, H₂S, gélatine, urée, citrate et ODC sont positifs.

Ces caractères biochimiques peuvent être facilement mis en évidence sur les galeries miniaturisées tels que l'Api 20 E (**Le Minor, 1993; Drzwiecka, 2016**).

6. Caractères génomiques

Le génome de *P. mirabilis* a été achevé le 28 Mars 2008, par Mélanie M., il est constitué de 24 gènes. La longueur totale du génome est de 4.063 Mb avec une teneur en GC de 38,88%. Il est constitué par un seul plasmide de 36,289 nucléotides. Le plasmide lui-même ne contient pas de gènes de virulence, mais il peut contenir une bactériocine.

L'analyse de la séquence a confirmé la présence des déterminants de virulence identifiés précédemment, ainsi que d'un régulon flagellaire 54 kb contiguë et 17 types de fimbriae (**Pearson et al., 2008 ; Holmes et al., 2008**).

7. Diagnostic différentiel

L'aspect morphologique, le Gram et les caractères culturels font évoquer une Entérobactérie et les caractères TDA +, ONPG -, H₂S + indiquent qu'il s'agit d'un *Proteus*.

Les caractères indole -, ODC +, maltose -, salicine -, esculine - différencient les espèces *mirabilis* de *vulgaris* (indole +, ODC -, maltose +, salicine v, esculine v) et *penneri* (indole -, ODC -, maltose +, salicine -, esculine -) (Le Minor, 1993 ; Drzwiecka, 2016).

8. Pouvoir pathogène chez l'homme

Les bactéries appartenant à l'espèce *P.mirabilis* sont responsables principalement d'infections urinaires communautaires ou nosocomiales. *P.mirabilis* grâce à son uréase puissante peut alcaliniser les urines et être responsable de lithiases. Ces lithiases se comportent comme du matériel étranger qui permet à l'infection de devenir chronique, entraînant ainsi une destruction progressive du parenchyme rénal (Stickler, 2009).

Elles sont responsables également d'infections localisées surtout cutanées, mais d'autres localisations sont possibles (abcès du cerveau, infections pleurales et péritonéales, infection de cathéter.....), d'infections des voies respiratoires surtout en milieu hospitalier (infections ORL et pneumopathies), de septicémies et de bactériémies (Archambaud et Clave, 2004).

9. Facteurs de Virulence

P. mirabilis, comme d'autres agents pathogènes, possède de nombreux facteurs de virulence qui sont importants pour établir l'infection et facilitent la colonisation d'un hôte.

- Elle possède au moins quatre différentes **adhésines** qui interviennent dans son attachement aux surfaces de tissu.
- Elle dispose d'une **capsule EPS** qui la protège contre les défenses de l'hôte et permet de se lier fortement aux surfaces.
- Elle sécrète une **hémolysine**, des **protéases** et des **désaminases** qui sont tous essentiels pour extraire les éléments nutritifs importants à partir de tissus hôtes et des fluides.
- Une **protéase spécifique à une immunoglobuline A (IgA)** qu'elle produit est capable de dégrader l'IgA prédominante dans le mucus sécrété à partir des surfaces épithéliales (Jacobsen *et al.*, 2008 ; Stickler, 2009).
- *P. mirabilis* produit au moins quatre types de **fimbriae**, qui contribuent et favorisent l'adhésion à des voies urinaires, mais ne sont pas absolument nécessaires pour induire une

infection. Au moins 2 d'entre eux contribuent à la colonisation des voies urinaires (Eleonora, 2012).

- En outre, elle présente deux caractéristiques de signature qui sont particulièrement importants dans les voies urinaires cathétérisés : la capacité de produire l'enzyme **uréase** et la capacité à **essaimer** rapidement sur les surfaces (Stickler, 2009).

9.1. L'uréase

L'uréase du *P.mirabilis* est une enzyme à haut poids moléculaire trouvés dans le cytoplasme de la cellule. Elle est responsable de l'hydrolyse de l'urée en ammoniacque, qui conduit à l'alcalinisation des urines à des valeurs de pH urinaires parfois de 7 ou 9 (Stickler, 2009 ; Eleonora, 2012).

9.2. L'essaimage

Les bactéries appartenant à l'espèce *P. mirabilis* sont capables de se déplacer rapidement dans un mode coordonné (essaimage) sur des surfaces solides (Figure 4). De cette façon, elles peuvent étendre leurs populations sur les surfaces et de coloniser de nouveaux endroits. Ces cellules Swarmer (Figure 5) peuvent également produire à des concentrations importantes de l'uréase, l'hémolysine et des protéases (Stickler, 2009).

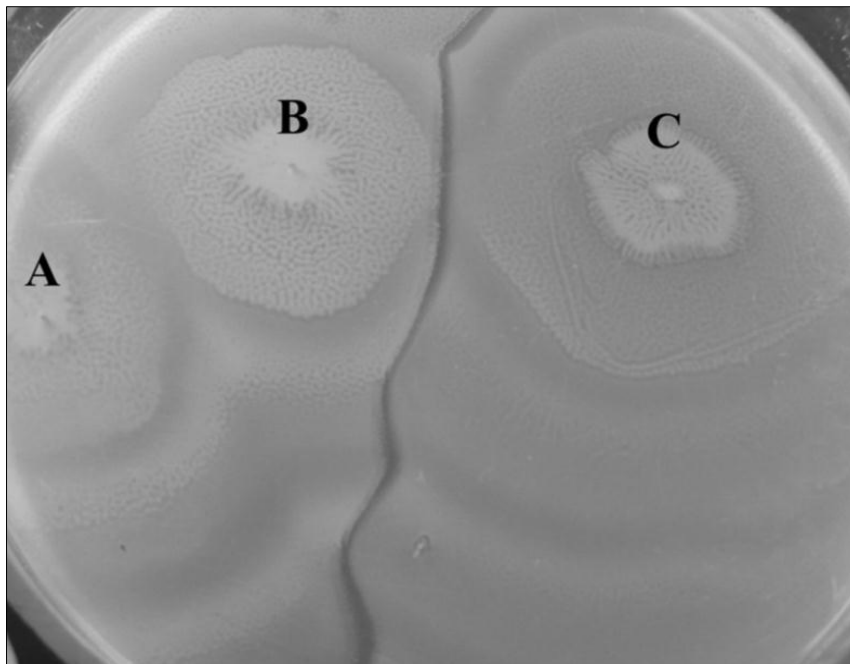


Figure 4 .Phénomène d'essaimage chez *P. mirabilis* caractérisé par des anneaux concentriques sur la surface de la gélose (Drzwiecka, 2016).

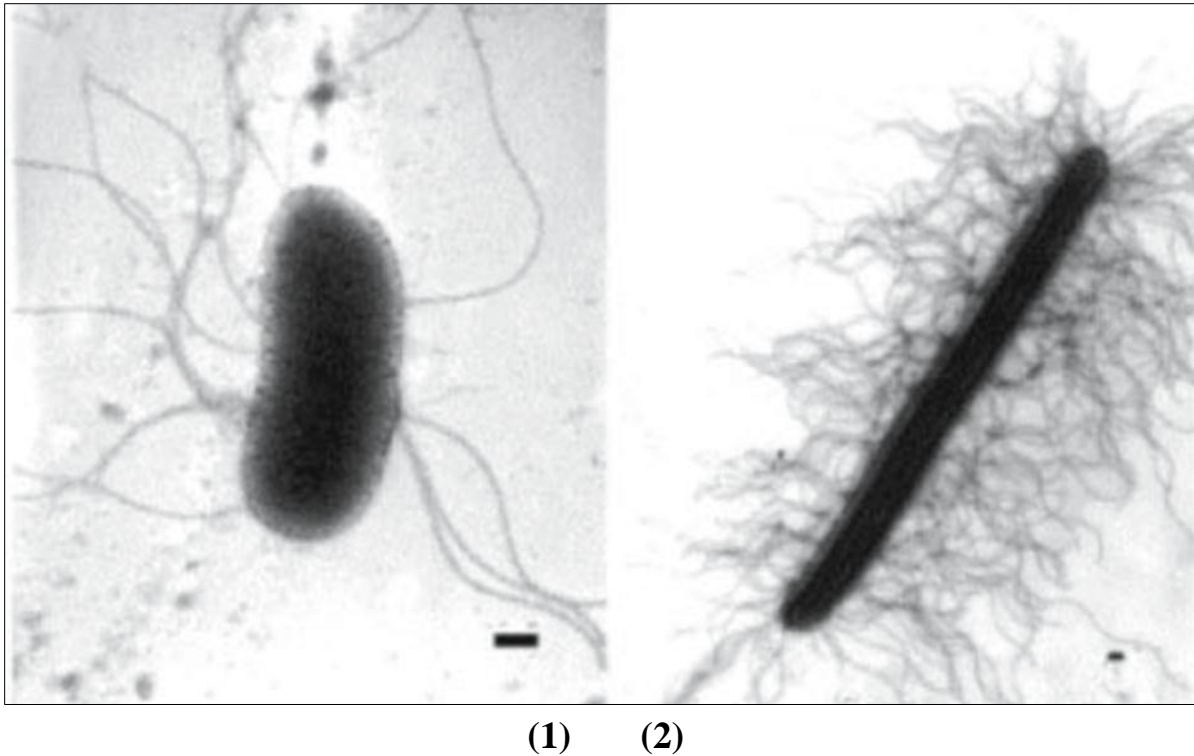


Figure 5 .Micrographies en microscopie électronique de *P. mirabilis*.

(1) Dans le cas normal (Cellules Swimmer), (2) : En cas d'essaimage (Cellules Swarmer)
(Eleonora, 2012).

10. Sensibilité aux antibiotiques

10.1. Résistance naturelle

P. mirabilis est naturellement résistant à la colistine, les cyclines (spécificité de l'espèce mirabilis) et les furanes. Les autres ATB, testés sur les bacilles à Gram négatif type Entérobactéries, sont habituellement actifs (β -lactamines, aminosides, quinolones, cotrimoxazole, chloramphénicol) (Archambaud et Clave, 2004).

10.2. Résistance acquise

P. mirabilis possède des mécanismes identiques à ceux décrits pour *E. coli*.

- Bêta-lactamase de classe A haut niveau (pénicillinase): des carbénicillinases (type PSE-4) ont été décrites.
- Résistance aux inhibiteurs des bêta-lactamases: un mutant de type TEM, IRT-2(Arg244Ser), a été décrit en association avec TEM-1 dans une souche insensible aux inhibiteurs des bêta-lactamases de classe A.
- Bêta-lactamases de classe A à spectre étendu (BLSE): une souche produisant TEM-10 a été décrite.

- Résistance à l'imipénème: chez *P. mirabilis*, elle n'est pas d'origine enzymatique. La résistance à l'imipénème semble associée à une altération des PLP1A et 2 (protéines liant la pénicilline) (Sougakoff *et al.*, 2003; Archambaud *et al.*, 2004).

11. Formation de biofilms cristallins par *P.mirabilis*

Certains micro-organismes présents dans les biofilms formés sur sondes urinaires produisent des uréases, entre autres : *P. mirabilis* (Clutterbuck, 2007 ; Hatt, 2008).

L'urée contenue dans l'urine du patient est hydrolysée par les uréases bactériennes et conduit à la formation d'hydroxyde d'ammonium. La libération d'ammoniaque sous forme libre dans l'urine entraîne une augmentation du pH au niveau de l'interface biofilm-urine et conduit à la précipitation de cristaux d'hydroxyapatite (Cristaux de phosphate de calcium) et de struvite (phosphate ammoniaco-magnésien), qui vont venir obstruer la lumière de la sonde (Chalvet de Rochemonteix 2009) Les cristaux formés s'entrappent dans le biofilm : il y a formation d'un biofilm cristallin (Figure 6). La présence de cristaux va créer des troubles urinaires : dysurie, strangurie, hématurie, distension vésicale,... Il peut aussi avoir des conséquences plus sévères comme des infections ascendantes par exemple des pyélonéphrites (Hatt, 2008).

P. mirabilis est l'agent le plus fréquemment à l'origine de la formation de biofilms cristallins, puisque cette bactérie produit une uréase 6 à 10 fois plus efficace que les autres uréases bactériennes (Tenke, 2006).

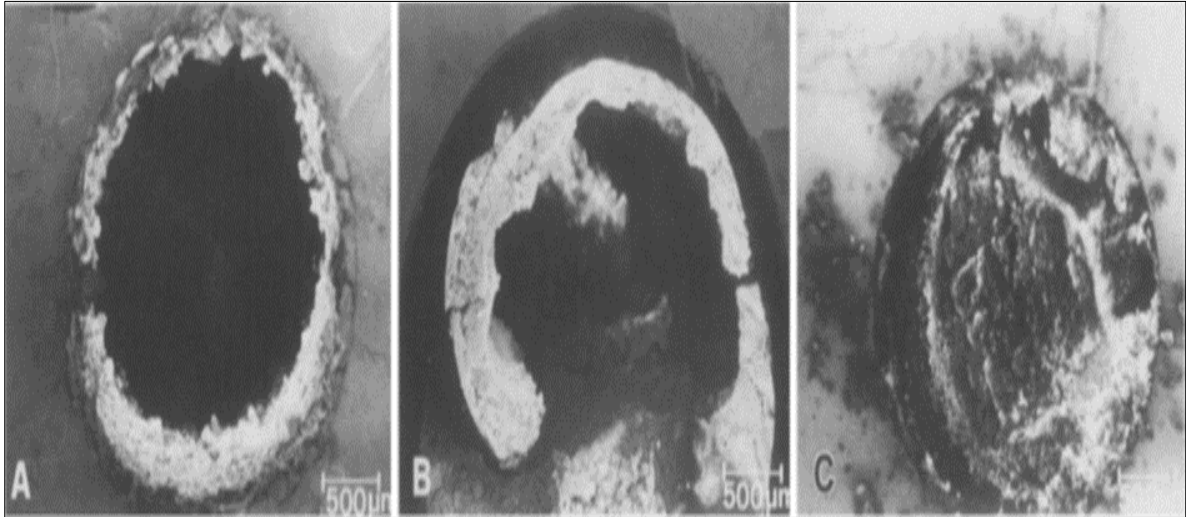


Figure 6 .Des coupes transversales des sondes urinaires colonisées par des cultures pures de *P. mirabilis* (Stickler *et al.*, 1993).

Partie II.

Matériel et Méthodes

1. Souches bactériennes

Cette étude a porté sur cinq souches de *P.mirabilis* provenant de divers prélèvements, recueillis dans différentes structures hospitalières de Centre Hospitalier-universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine, durant la période allant de 31/01/2016 jusqu'à 08/04/2016 (Tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques des patients.

Souche	Patient		
	Nature de Prélèvement	Sexe	Service
P 1	Pus	Homme	Traitement en ambulatoire
P 2	Pus d'une fistule	Femme	Gastro-entérologie
P 3	Drain	Homme	Médecine interne
P 4	Urine	Femme	Infectiologie
P 5	Sonde vésicale	Femme	Urgences médicales

2. Traitement des échantillons

Le traitement des sondes urinaires et drains nécessite une préalable immersion et incubation dans le bouillon cœur cerveau (BCC). Ce dernier est ajouté à chaque écouvillon contenant l'échantillon à analyser de manière à ce que les parties distales soient complètement immergées. Par la suite, les écouvillons sont incubés à 37 °C pendant 15 minutes.

Après homogénéisation des milieux d'enrichissement, une quantité est prélevée etensemencée sur les milieux d'isolement.

3. Isolement et identification de *P. mirabilis*

3.1. Isolement

L'isolement est pratiqué sur gélose nutritive (GN) et l'Hektoen préalablement coulés en boîtes de Pétri. Les milieux sontensemencés, en stries serrées sur la surface, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37 °C pendant 24 heures.

Des repiquages successifs sont effectués, sur les milieux d'isolement d'origine, afin de confirmer la pureté des souches pour entreprendre l'étape d'identification.

3.2. Identification

L'identification des souches est contrôlée, après vérification de leur pureté par :

3.2.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation, qui permet l'étude des caractères visibles à l'œil nu : formes, taille, couleur et aspect.

Seules les colonies caractéristiques du genre *Proteus* seront prises en considération accompagnées d'une odeur caractéristique du poisson pourri.

3.2.2. Examen microscopique

Des examens microscopiques après coloration de Gram sont réalisés dans le but d'observer le type de Gram (positif ou négatif), la morphologie des cellules ainsi que leurs modes de regroupements.

3.2.3. Galerie classique

L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques.

- **Préparation de l'inoculum**

Une suspension bactérienne homogène est préparée, dans de l'eau distillée stérile, avec une colonie prélevée à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures sur GN.

- **Inoculation de la galerie**

A l'aide d'une pipette pasteur, les tubes sontensemencés par la suspension bactérienne déjà préparée. La série des milieux utilisés est détaillée dans le **tableau 4** Ci-dessous. L'incubation se fait à 37° C pendant 24 h.

Tableau 4. Milieux constitutifs de la galerie classique.

Test	Milieu de culture	Mode d'ensemencement
Etude de la production d'H ₂ S et la fermentation du lactose, du saccharose et D-glucose	T.S.I. (Triple Sugar Iron Agar)	- Ensemencement du culot par pique centrale et de la pente par des stries serrées.
Etude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone	Citrate de Simmons	- Ensemencement par des stries le long de la pente.
Etude de la fermentation du mannitol et la mobilité	Mannitol Mobilité	- Ensemencement par pique centrale.
Recherche de l'uréase, TDA et production d'indole	Urée Indole	- Ce milieu est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne. - Après incubation, 2 à 3 gouttes de réactifs Kovacs sont ajoutées. La lecture est immédiate.
Mise en évidence des décarboxylases: LDC, ODC et ADH	Moeller	- Ce milieu est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, en plus d'une couche d'huile de paraffine.

3.2.4. Identification par la galerie API 20 E

- **Principe**

API 20 E (Biomériaux) est un système standardisé pour l'identification d'*Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif.

- **Préparation de l'inoculum**

- Une colonie est prélevée sur GN et en suite mise dans un tube de 5 ml d'eau distillée stérile, afin d'obtenir une suspension bactérienne.

- **Inoculation de la galerie**

- Homogénéiser la suspension bactérienne.
- Pour les tests CIP, VP, GEL remplir les tubes et les cupules.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.
- Recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H₂S, URE avec 2 gouttes d'huile de paraffine.

- **Lecture et interprétation**

- L'interprétation de la galerie s'effectue après incubation 24 h à 37 °C, en se référant au tableau de lecture (**Annexe 2.7**).

4. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité de toutes les souches isolées, vis-à-vis de différentes familles d'ATB, est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (**La standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, avec collaboration de l'OMS, 2011**).

Le **tableau 5** Représente la liste des ATB testés sur *P. mirabilis* selon les recommandations du CLSI.

Tableau 5. Les antibiotiques testés sur les souches de *P. mirabilis*.

N°	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
01	Ticarcilline	TIC	75	β-Lactamines
02	Imipenème	IPM	10	β-Lactamines
03	Amoxicilline	AML	25	β-Lactamines
04	Céfazoline	KZ	30	β-Lactamines
05	Augmentin	AMC	30	β-Lactamines
06	Céfoxitine	FOX	30	β-Lactamines
07	Céfotaxime	CTX	30	β-Lactamines
08	Gentamycine	CN	10	Aminosides
09	Amikacine	AK	30	Aminosides
10	Acide nalidixique	AN	30	Quinolones
11	Sulfaméthoxazole / Triméthoprime	SXT	1.25/23.75	Sulfamides
12	Chloramphenicol	C	30	Phénicoles
13	Ciprofloxacine	CIP	05	Fluoroquinolones
14	Colistine	CT	/	Polymyxines

- **Procédure opératoire**

A partir d'une culture de 24 heures, 3 colonies identiques sont prélevées puis inoculées dans l'eau physiologique.

L'écouvillon stérile est plongé dans la suspension bactérienne. Le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois internes de tubes afin de les décharger au maximum. À l'aide de cet écouvillon, la boîte estensemencée sur toute la surface de la gélose par des stries serrées, en tournant la boîte trois fois de 60 °.

À l'aide d'une pince préalablement flambée, les disques d'ATB sont appliqués sur la surface de la gélose. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 16 à 18 heures.

Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'ATB, sont mesurés. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations de CLSI (**Annexe 3.2**).

5. Etude de la formation de biofilm chez *P. mirabilis*

Afin de mettre en évidence la capacité de formation du biofilm, chez les 05 isolats cliniques de *P. mirabilis*, la méthode choisie est la méthode standard de coloration au Cristal Violet (CV) (**Djordjevic et al., 2002 ; Musk et al., 2005**).

Une suspension bactérienne (DO 600 = 0,20) est préparée, dans un tube de bouillon nutritif (BN) (pH=7), à partir d'une culture de 24 heures sur GN. La suspension est répartie dans des tubes en polystyrène de 5 ml à raison de 2 ml par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 h.

Après la période d'incubation et pour chaque tube, l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Shimadzu**). Après, chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et rincé 3 fois à l'eau distillée.

La biomasse fixée sur les parois du tube est révélée après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de CV à 1 % (m/v). Après un temps de contact de 45 minutes, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'eau distillée (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes). Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre.

Le CV fixé sur les parois du tube est solubilisé à l'aide d'une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25). Après 1 heure du temps, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm.

6. Effet du pH sur l'adhésion de *P. mirabilis*

Afin d'étudier l'influence du pH sur l'adhésion de *P. mirabilis*, des suspensions bactériennes à différents pH (pH=5 et pH=9) ont été aseptiquement préparées dans le BN à partir des cultures jeunes sur GN.

Après 24 heures d'incubation, la capacité de la formation du biofilm est également testée par la méthode de CV comme décrit ci-dessus.

7. Détermination de l'hydrophobicité de *P. mirabilis*

L'adhésion microbienne aux solvants, communément appelée MATS, pour Microbial Adhésion To Solvants, est couramment employée pour déterminer l'hydrophobicité relative des cellules microbiennes (Rosenberg, 1980 ; Pelletier *et al.*, 1997; Bellifa, 2014; M'Hamedi, 2015).

Les souches bactériennes sont mises en culture à 37°C durant 24 h dans le BN à partir d'une culture jeune de *P. mirabilis*.

Les suspensions bactériennes ainsi préparées sont centrifugées pendant 15 minutes à 1000 g à l'aide d'une centrifugeuse (SIGMA). Le culot obtenu est lavé deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile (0.1 N) et remis en suspension dans le même tampon, la densité optique DO_i est fixée entre 0,8 et 1 à l'aide d'un spectrophotomètre.

3 ml 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'xylène (SIGMA -ALDRICH). Le mélange est agité au vortex pendant environs 1 minute puis est laissé à décanter 15 minutes pour avoir une séparation complète entre les phases organique et aqueuse. Ensuite la densité optique DO de la phase aqueuse est mesurée à 600 nm.

Partie III.
Résultats et
Discussion

1. Isolement et identification de *P.mirabilis*

Sur une période de deux mois, des souches appartenant à l'espèce *P. mirabilis* ont été isolées et identifiées, après traitement de divers échantillons cliniques, dont cinq souches seulement ont été sélectionnées à fin d'étudier l'influence du pH du milieu de culture ainsi que l'hydrophobicité de surface cellulaire sur l'adhésion bactérienne.

Ces souches (**P1**, **P2**, **P3**, **P4** et **P5**) proviennent respectivement d'une variété de prélèvements ; pus, pus d'une fistule, drain, échantillon d'urine et sonde vésicale.

La présence des souches appartenant au genre *Proteus* a été suspectée sur la base des examens macroscopiques et microscopiques réalisés. Les colonies suspectées ont ainsi été isolées séparément sur les deux milieux de culture, GN et Hektoen, puis purifiées sur la gélose nutritive ordinaire pour une éventuelle identification.

Le **tableau 6** ci-dessous récapitule les aspects de colonies de *P. mirabilis* sur les deux milieux d'isolement, l'aspect microscopique après coloration de Gram ainsi que l'identification biochimique par galerie classique et par galerie miniaturisée API 20 E.

Tableau 6. Les résultats d'isolement et d'identification de *P. mirabilis*.

Examen	Milieu de culture		Aspect de colonies								
	Macroscopique	Gélose Nutritive	Envahissement de la gélose en voile montrant des vagues successives, avec une odeur caractéristique désagréable (Annexe 2.1).								
		Gélose Hektoen	Colonies lisses, bombées et brillantes. La couleur du milieu ne change pas (ne fermente pas le lactose) (Annexe 2.2).								
microscopique	L'examen microscopique après coloration de Gram révèle la présence des bacilles, colorés en roses ce qui montre que ce sont des bacilles à Gram négatif. (Annexe 2.3).										
Galerie classique	Test		Résultat (Annexe 2.4)								
	Fermentation du lactose, glucose, saccharose et production de gaz et d' H ₂ S		Acidification dans le culot et la pente, avec présence des bulles d'air et de noircissement. Donc <i>P.mirabilis</i> est : Lactose (-), Saccharose (+), Glucose (+), Gaz (+) et H ₂ S (+).								
	Utilisation de citrate		Absence de virage du vert au bleu, ce qui indique que la bactérie est Citrate (-).								
	Utilisation de mannitol et test de mobilité		Absence d'acidification du milieu, milieu reste rouge. Elle est mannitol(-). La bactérie diffuse à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble. Elle est mobile (+).								
	Recherche de l'uréase et l'indole.		Elle est uréase (+) puisqu'il y a eu une alcalinisation du milieu d'où le virage de la couleur de l'orange vers le l'orange foncé. Après l'ajout de réactif de Kovacs, aucune apparition d'anneau rouge. Elle est Indole(-).								
	Recherche des décarboxylases: (LDC), (ODC) et (ADH)		Apparition de la couleur jaune pour LDC et ADH (négatif) tandis que l'ODC reste violet (positif).								
Galerie API 20 E	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	
	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

2. La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées

La détection des phénotypes de résistance, des souches bactériennes isolées, a été réalisée en pratiquant la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du CLSI (**Annexe 3**).

Les profils de résistances déterminés montrent que les 05 souches de *P. mirabilis* présentent différents comportements vis-à-vis les ATB testés. Le **tableau 7** ci-dessous détaille les profils de sensibilités des souches étudiées.

Tableau 7. Les profils de sensibilités aux ATB des souches étudiées.

(S : Sensible, R : Résistant, I : Intermédiaire)

Famille	N°	ATB	P1	P2	P3	P4	P5
β-Lactamines	01	TIC	S	S	R	R	S
	02	IPM	S	S	S	S	S
	03	AML	S	S	R	R	S
	04	KZ	S	S	R	S	S
	05	AMC	S	S	R	R	S
	06	FOX	S	S	S	S	S
	07	CTX	S	S	R	S	S
Aminosides	08	CN	S	S	R	R	S
	09	AK	S	S	R	S	S
Quinolones	10	AN	R	R	R	S	S
Sulfamides	11	SXT	R	R	R	S	S
Phénicolés	12	C	R	S	R	R	R
Fluoroquinolones	13	CIP	I	R	R	S	S
Polymyxines	14	CT	R	R	R	R	R

Selon les profils déterminés, certaines souches sont sensibles et d'autres sont résistantes. La souche **P3** exprime le taux de résistance le plus élevée. En effet, cette résistance est notée pour 12 ATB testés sur 14 (**Figure 7 et Annexe 3**). En deuxième position, la souche **P4** résiste à 6 ATB. Contrairement aux autres souches, la souche **P5** apparaisse sensible à l'ensemble des ATB (Résiste seulement à la colistine et au chloramphénicol).

En outre, les souches **P1, P2** (qui sont résistantes au même nombre d'ATB) et **P5** apparaissent sensibles à l'ensemble des ATB apparentant aux bêta-lactamines et aminosides.

IPM et **FOX**, appartenant aux β-lactamines, ont été les molécules les plus actives sur l'ensemble des souches.

P. mirabilis est naturellement résistante aux polymyxines (Mahamat *et al.*, 2006), ce qui est en accord avec nos résultats d'antibiogrammes.

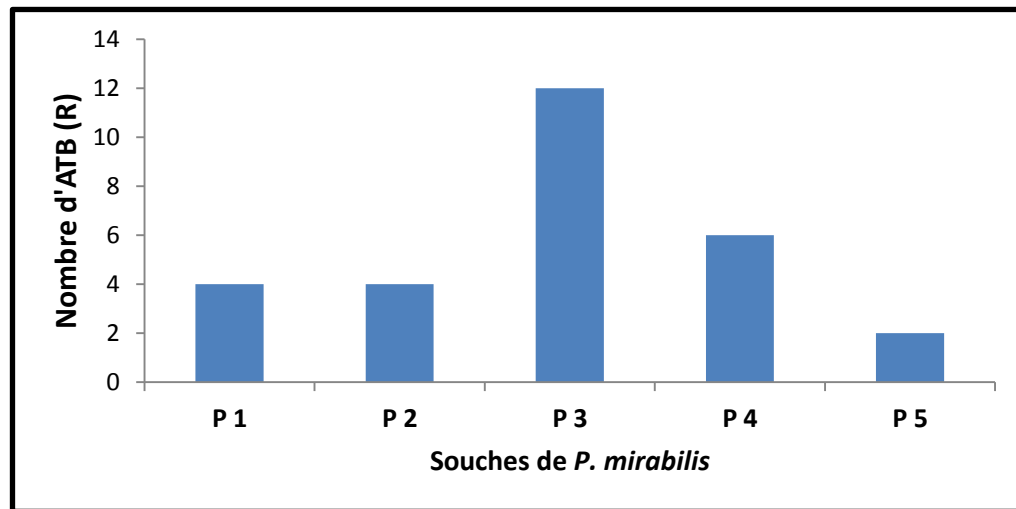


Figure 7. Nombre d'ATB correspondant à la résistance chez les souches de *P. mirabilis*

3. Effet du pH sur la formation des biofilms de *P. mirabilis*

La formation de biofilm est un phénomène complexe sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels: la surface à coloniser, le milieu environnant et les microorganismes (Branger *et al.*, 2007).

Afin d'étudier l'influence du pH du milieu de culture sur l'adhésion de cette bactérie, le BN a été préalablement préparée à différents pH puis inoculée par les souches étudiées selon le protocole déjà détaillée.

Les valeurs de pH sélectionnées sont : **pH 5** (acide), **pH 7** (neutre) et **pH 9** (basique). Les différentes expériences ont été menées sur les 05 souches de *P. mirabilis*.

3.1. Effet du pH sur la croissance des cellules planctoniques

La formation de biofilm bactérien est toujours en transition entre deux formes ; la forme fixée (biofilm) et la forme libre (planctonique).

La technique de coloration CV permet d'évaluer la proportion de cellules de *P. mirabilis* planctoniques, non fixées sur polystyrène par la mesure de la densité optique à 600 nm. La mesure doit se faire avant l'élimination de la culture bactérienne, une étape nécessaire avant d'entamer la coloration au CV.

Les résultats de croissances bactériennes (DO 600 nm) en fonction du pH, obtenus pour les différentes souches étudiées, après 24 heures d'incubation en BN, sont illustrés dans la **figure 8**.

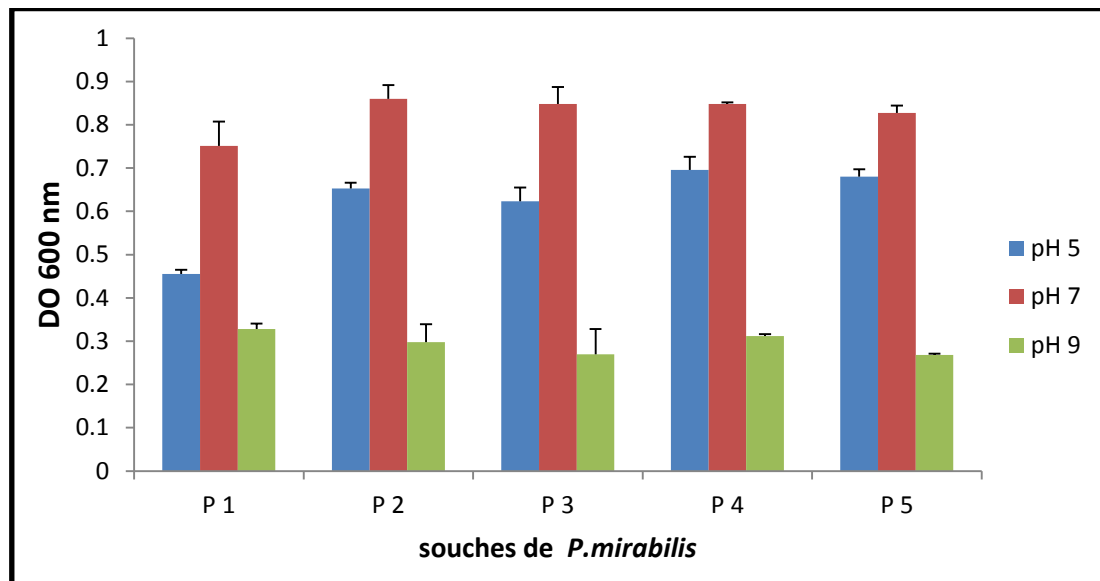


Figure8. Effet du pH sur la croissance des cellules planctoniques de *P. mirabilis* (Valeurs moyennes et écarts-types calculés à partir de trois essais).

Il a été constaté que le pH acide ou basique, du milieu de culture, a un effet remarquable sur la croissance des cellules planctoniques. En effet, pour l'ensemble des souches étudiées, cet effet se traduit par des réductions significatives de la croissance des cellules planctoniques pour les deux pH acide et basique et qui est plus remarqué pour le milieu basique.

Par ailleurs, ces résultats ont démontré que le pH optimale favorable pour leurs croissance c'est bien le **pH 7**. De même, ce facteur n'a aucun effet de mortalité sur les cellules planctoniques après 24 heures d'incubation.

La valeur de DO 600 la plus élevée, en milieu basique, est notée pour la souche **P1** (0,328) et en milieu acide est notée pour la souche **P4** (0,696). En plus, les valeurs de DO 600 traduisant la croissance des cellules planctoniques en milieu neutre, sont presque proches ; la souche **P2** a donné le maximum de croissance avec une valeur égale à 0,860. tandis que la valeur la plus faible est enregistrée pour la souche **P1**(0,751).

Les deux souches responsables d'infections urinaires à savoir **P4** et **P5** donnent les valeurs de DO les plus importantes en milieu acide. Ce qui est certainement en rapport avec leurs prélèvements d'origine.

3.2. Effet du pH sur l'adhésion des cellules sessiles

Dans cette étude, la mise en évidence de la capacité à former des biofilms à différents pH par les souches cliniques de *P. mirabilis* est basée sur la technique de la coloration du biofilms formés au CV.

Les résultats obtenus, après 24 heures d'incubation à 37 °C, ont permis de mettre en évidence la capacité de toutes les souches de *P. mirabilis* isolées à former des biofilms sur tubes en polystyrène (surface hydrophobe) après culture en BN à **pH 7**.

L'observation visuelle des tubes montre que la formation du biofilm de *P. mirabilis* se caractérise, non seulement par la présence d'un anneau à l'interface air-liquide (à l'exception de la souche **P4**), mais également par la présence d'un prolongement de la croissance cellulaire en dessous de celui-ci. L'intensité de l'anneau formé est variable d'une souche à l'autre (**Annexe 4**).

Ce phénomène est probablement dû à l'existence de structures d'adhésion tel que la présence de fimbriae et de flagelles (**Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Baillif et al, 2010**).

L'étude de **Aniejurengo et al., (2015)** a également révélée une prévalence élevée des producteurs de biofilm chez les souches cliniques de *P. mirabilis*, lors de l'évaluation de la capacité de ces souches à former des biofilms sur microplaques en polystyrène. Ce qui est en accord avec nos résultats.

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, la formation des biofilms à différents pH, chez les souches étudiées, sur tubes en polystyrène a été exprimée en absorbances mesurées à 570 nm du colorant CV incorporé par les cellules formant des biofilms. Par conséquent, la coloration absorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (**Musk et al., 2005**).

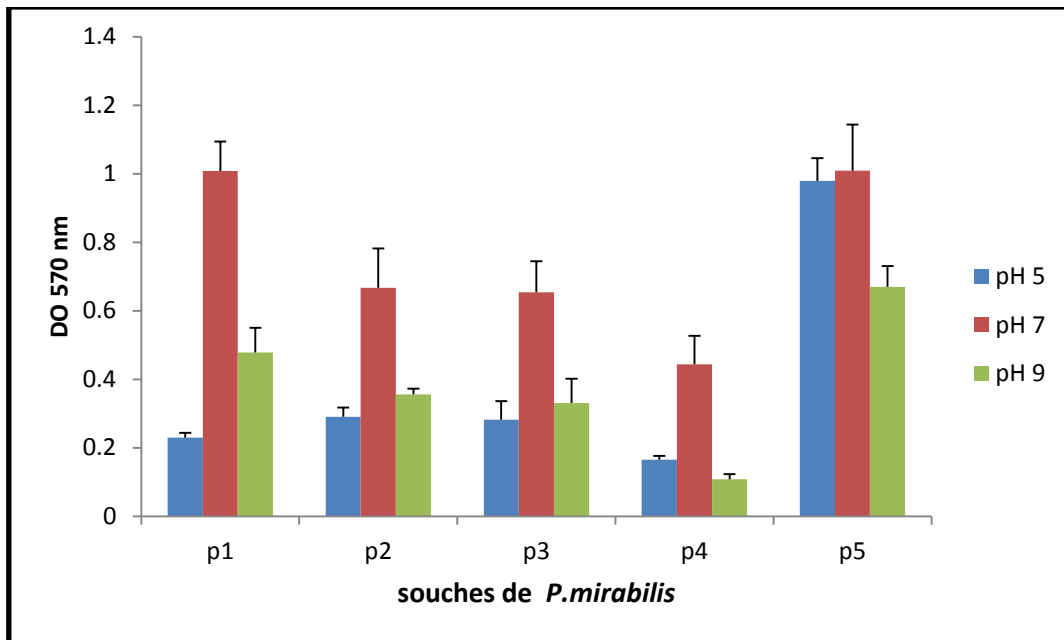


Figure 9. Effet du pH sur l'adhésion des cellules de *P. mirabilis* fixées sur polystyrène. (Valeurs moyennes et écarts-types calculés à partir de trois essais).

La production de biofilm in vitro dépend d'un certain nombre de facteurs physiques et chimiques, tels que la composition de la culture, température, pH, oxygène, etc. (Harjai *et al.* 2005; Di Bonaventura *et al.*, 2007; Hořtacká et Čiřnár, 2007).

Le but de la première partie de ce travail est d'étudier l'impact du pH sur la formation de biofilm chez des souches pathogènes de *P. mirabilis*. En effet, des suspensions bactériennes à différents pH (**pH5**, **pH7** et **pH9**) ont été aseptiquement préparées dans le BN à partir des cultures jeunes sur GN. Après 24 heures d'incubation, la capacité de la formation du biofilm a été également testée par la méthode de CV (**Annexe 5**). Les résultats obtenus suite aux tests d'adhésion, illustrés dans la **figure 9**, ont permis de mettre en évidence plusieurs comportements selon les souches à différents pH.

A première vue, la production de biofilm la plus importante pour l'ensemble des souches est enregistrée dans le milieu neutre à **pH 7**. La valeur la plus importante est notée pour la souche **P5** (DO 570 = 1,009) et la plus faible pour la souche **P4** avec une absorbance de DO 570 = 0,444.

En effet, la production maximale de biofilm chez cette bactérie nécessite l'union d'une multitude de conditions optimales parmi lesquelles le pH du milieu de culture

Pour les deux autres milieux, la fixation de trois premières souches (**P1**, **P2** et **P3**) sur polystyrène en milieu basique est mieux qu'en milieu acide. Les valeurs d'absorbances enregistrées sont respectivement, DO 570 = 0,478 ; 0,356 ; 0,331 pour le milieu basique et DO 570 = 0,230 ; 0,291 ; 0,282 pour le milieu acide.

Par opposé, une augmentation significative de la capacité d'adhésion des cellules bactériennes, en milieu acide, est constatée pour les deux dernières souches urinaires (**P4** et **P5**). Les valeurs de DO 570 notée sont respectivement 0,165 et 0,979 pour le milieu acide et 0,108 et 0,670 pour le milieu basique.

En outre, la souche **P5** possède une grande capacité à se fixer efficacement sur le polystyrène dans les trois milieux, en comparaison avec le reste.

Les résultats obtenus pour les trois premières souches semblent être en accord avec ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont démontré que l'adhésion bactérienne en milieu basique est plus importante qu'en milieu acide. En effet, la production de biofilm chez *P. aeruginosa* est supérieure à pH 8 qu'à pH 5-6, qui est expliquée par la production implorante d'alginate. **Heyde et al.** (1987) ont décrit que l'élargissement de porines de la membrane externe de la paroi cellulaire bactérienne à un pH supérieur peut contribuer à l'accumulation de carbone et, par conséquent, à une synthèse supérieure d'alginate (**Hošťacká et al., 2009**).

Une association similaire entre l'augmentation de pH et la production de biofilm a également été démontré chez *Stenotrophomonas maltophilia* (**Di Bonaventura et al., 2007**). D'autre part, une corrélation positive entre le pH basique des milieux de culture et la production de biofilms a été vérifiée chez des souches de *P. aeruginosa*, vibron et *Klebsiella pneumoniae* (**Hošťacká et al., 2009**).

Aussi, **Hamadi et al. (2012)** montre que le phénomène d'adhérence quantitative de *S. aureus* au verre est largement affecté par le pH du milieu.

Les observations obtenus pour les deux autres souches **P4** et **P5** peuvent être expliqués par la nature de leurs prélèvements. La première a été préalablement isolée à partir d'urine et la deuxième à partir d'une sonde urinaire.

P. mirabilis a une grande capacité à migrer sur surfaces solides via un processus appelé essaimage et à former par conséquent des biofilms sur biomatériaux tels que les sondes urinaires (**Coker et al., 2000 ; Aniejurengo et al., 2015**). En plus, *P. mirabilis* est la principale bactérie étiologique dans les infections des voies urinaires associées aux sondes urinaires en particulier celles insérées à long terme (**Aniejurengo et al., 2015**).

4. Relation entre antibiorésistance et formation des biofilms chez

P. mirabilis

L'analyse des résultats obtenus, en ce qui concerne la formation de biofilm dans des conditions optimales (**pH 7**) ainsi que la résistance aux ATB, a montré que la souche la plus résistante n'est pas forcément la forte productrice de biofilm et vice versa. Ainsi, la souche **P3**, isolée à partir d'un dispositif médical (drain), est la plus résistante mais n'est pas obligatoirement la souche la plus formatrice de biofilm (DO 570 =0,654). Contrairement à la souche **P5**, isolée aussi à partir d'un autre dispositif médical (sonde urinaire) qui est une bonne formatrice de biofilm (DO 570 =1,009), mais elle est la plus sensible.

Ces résultats montrent qu'il n'existe aucune corrélation directe entre la résistance aux ATB de nos souches et leur capacité à former des biofilms, dans des conditions favorables et la confirmation vient par la comparaison entre les souches **P1** et **P2** qui ont presque les mêmes profils de sensibilités mais ne forment pas les biofilms de la même manière. Les valeurs de DO 570 nm pour les souches **P1** et **P2** sont respectivement 1,008 et 0,667 (**Figure 10**).

Par ailleurs, le phénotype de résistance n'a rien avoir avec la formation de biofilm. Donc, pas forcément qu'une bactérie qui est notée comme bonne formatrice de biofilm soit résistante aux ATB et vice versa. Ce qui explique que la formation de biofilm est un phénomène complexe sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels: la surface, le milieu et les microorganismes (**Branger et al., 2007**).

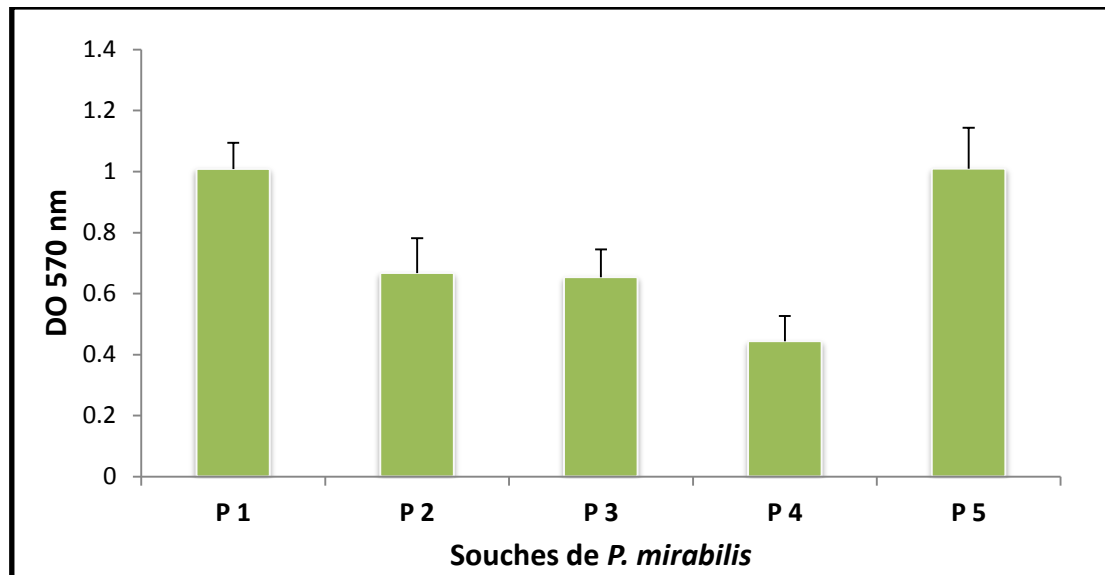


Figure 10. Formation du biofilm chez les souches de *P. mirabilis* à pH 7.

5. Influence de l'hydrophobicité de surface cellulaire sur l'adhésion de *P. mirabilis*

L'objectif de cette deuxième partie du travail expérimental, vise à déterminer si les souches de *P. mirabilis* sont hydrophiles ou hydrophobes et quel est l'effet de cette hydrophobicité sur l'adhésion.

Ainsi sur la base des résultats précédemment obtenus, sur les tests d'adhésion, les pourcentages d'hydrophobicité ont été comparés avec les résultats de la formation de biofilm en milieu neutre.

L'hydrophobicité de surface peut être estimée par le test MATS. La méthode MATS consiste à mettre en contact une suspension bactérienne de DO connue avec un solvant. Après une brusque agitation et décantation, 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 (Skvarla *et al.*, 2002).

Dans cette étude, l'xylène a été utilisé pour déterminer les pourcentages d'hydrophobicité, qui est un solvant apolaire. Après un repos permettant la séparation des phases (Annexe 6), la DO de la phase aqueuse (DO_f) est lue à 600 nm, permettant ainsi l'obtention du pourcentage des bactéries qui ont adhérees au solvant par la formule suivante :

% d'adhésion = $((DO_i - DO_f) / DO_i) \times 100$ indiquant si la bactérie est hydrophobe ou hydrophile.

D'après **Lee et Yii (1996)** et **Bellifa (2014)**, une bactérie est hydrophobe lorsque 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.

Comme l'illustre la **figure 11**, les chiffres de DO 600 obtenus permettent de classer les souches étudiées en deux catégories seulement ; *P. mirabilis* à surface hydrophobe (**P1**), environ 58,8 %) et *P. mirabilis* à surface moyennement hydrophobe (**P2, P3, P4 et P5**), de 25,9 % à 43,23 %. Ce qui indique que l'hydrophobicité d'une bactérie varie suivant les souches d'une même espèce. Elle est influencée par le milieu environnant, l'âge de la bactérie, ainsi que par sa structure (**Baillif et al, 2010**).

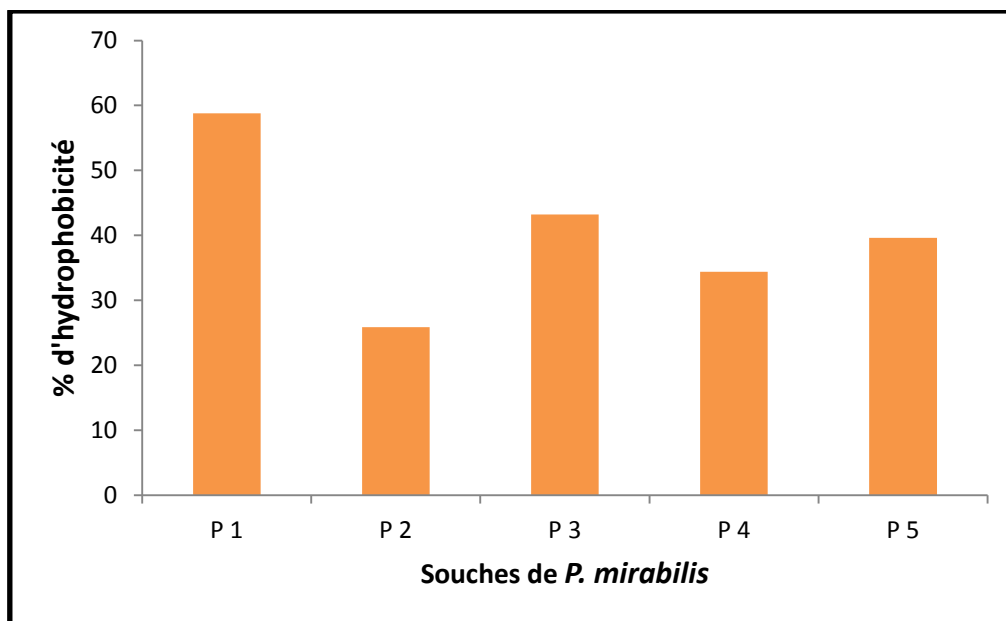


Figure 11. Pourcentages d'hydrophobicité de surface cellulaire de *P. mirabilis*.

D'après **Donlan (2002)**, l'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'EPS influencent l'attachement des bactéries sur une surface.

Par ailleurs, plusieurs travaux antérieurs ont montré que l'adhésion des bactéries hydrophobes est généralement supérieure à celle des bactéries hydrophiles car 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 (**Bruinsma et al., 2001 ; Gallardo-Moreno et al., 2002 ; Bayoudh et al., 2006**).

Il a été également démontré par **Bruinsma et al. (2001)**, 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 epidermis* (hydrophile) quel que soit l'hydrophobicité du support. L'étude de **Boutaleb (2008)** 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.

En outre, d'autres auteurs ont suggéré qu'il existe une corrélation positive entre le degré d'hydrophobicité bactérienne et l'adhérence sur les surfaces abiotiques (**M'Hamedi, 2015**).

Dans ce travail, cette relation est détectée entre l'hydrophobicité de surface cellulaire et la formation de biofilm. Par conséquent, la souche hydrophobe (**P1**) forme un biofilm important et les autres souches moyennement hydrophobes forment également des biofilms plus faibles que cette souche mais elles sont toutes productrices de biofilm malgré qu'il existe une variabilité entre ces souches. En outre, la plus faible valeur, obtenue pour la souche **P4** (0,44), indique une formation non négligeable de biofilms.

Ces observations sont en désaccord avec celles rapportées par **M'Hamedi (2015)**, après l'étude de l'hydrophobicité d'*Acinetobacter baumannii*. Il a révélé qu'il n'existe aucune relation entre hydrophobicité et la formation de biofilm vu que la souche la plus hydrophile forme un biofilm semblable à celui de la souche la plus hydrophobe.

Par conséquent, les souches de *P. mirabilis* étudiées, semblent exhiber un comportement semblables à celui d'autres bactéries pathogènes comme *Neisseria meningitidis* et *Stenotrophomonas maltophilia*, qui expriment une corrélation directe entre l'hydrophobicité de leurs surfaces et la formation de biofilm sur le verre et sur le plastique, respectivement (**Yi et al., 2004 ; Di Bonaventura et al., 2008 ; McQueary et Actis, 2011**).

Enfin, le mode de vie des bactéries en biofilm, responsable d'infections, est souvent lié à la structure pariétale de la bactérie et la nature de surface qui influencent leur adhésion. L'adhérence peut se faire sur différents supports, chacun ayant des caractéristiques d'hydrophobicité et de charges de surface différentes, ce qui peut favoriser ou non l'adhérence microbienne en fonction des souches bactériennes utilisées (**Bellifa, 2014**).

Conclusion

Conclusion

La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *P. mirabilis*. Le rôle pathogène des biofilms est maintenant bien établi dans les infections chroniques et en particulier les infections urinaires.

Cinq souches de *P. mirabilis* ont fait l'objet de l'étude de l'impact de deux paramètres physicochimiques sur l'adhésion et la formation de biofilm par cette bactérie, à savoir le pH du milieu de culture et l'hydrophobicité de surface cellulaire.

L'étude de l'antibiorésistance a montré que les souches étudiées présentent différents profils et que toutes les souches s'avèrent sensibles à l'imipénème et la céfoxitine appartenant aux β -lactamines.

Les termes de bactéries planctoniques et bactéries sessiles décrivent des cellules respectivement libres dans une suspension et adhérentes à une surface. Les résultats obtenus ont montré que le comportement de différentes souches, que se soit planctoniques ou sessiles, varie en fonction du pH de milieu de culture. Ainsi, les proportions des cellules non fixées les plus importantes ont été enregistrées pour le pH optimal. Par ailleurs, les deux pH acide et basique ont un effet remarquable sur la croissance des cellules planctoniques. Par conséquent, cet effet se traduit par des réductions significatives de la croissance.

D'autre part, les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de *P. mirabilis* ont la capacité d'adhérer au polystyrène principalement à l'interface air – liquide des tubes, sous forme des anneaux visibles. Evidemment, les DO 570 mesurées ont révélé que la production de biofilm la plus importante est notée pour le milieu neutre et que la souche, précédemment isolée à partir d'une sonde urinaire, était fortement formatrice de biofilm tandis que la souche, préalablement isolée à partir d'urine, était faiblement formatrice.

Les résultats obtenus ont également indiqué que l'adhésion bactérienne en milieu basique est plus importante qu'en milieu acide pour les 3 premières souches par opposé aux deux dernières souches d'origine urinaire.

L'étude de l'hydrophobicité chez *P. mirabilis* a décelé que ce paramètre varie suivant les souches d'une même espèce. Effectivement, les chiffres obtenus ont permis de classer les souches étudiées en deux catégories ; hydrophobes et moyennement hydrophobes. En effet, cette bactérie, semble exhiber un comportement semblable à celui d'autres bactéries pathogènes, qui expriment une corrélation directe entre l'hydrophobicité de leurs surfaces et la formation de biofilm.

L'éradication des biofilms bactériens indésirables représente un challenge continu pour les cliniciens. Une meilleure compréhension des facteurs physico-chimiques pouvant influencer l'adhésion bactérienne devrait permettre de trouver des outils thérapeutiques capables de lutter contre cette structure dynamique qui est responsable en grande partie d'échec de l'antibiothérapie.

Référence
Bibliographique

Références bibliographique

A

- Alnnasouri M. (2010). Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de lorraine, France.
- Aniejurengo OUV., Dessi M., Meikle S., Santin M. (2015). Biofilm formation in uropathogenic strains of *Proteus mirabilis* and their susceptibility to poly (epsilon-lysine) dendron. *Biosciences Research in Today's World* 1(1): 1-9.
- Annous B., Fratamico P. and Smith J. L. (2009). Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do!, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.
- Archambaud M., Clave D. (2004). Fiche technique : *Proteus mirabilis* BLSE. Centre toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. 51 : 8-543.

B

- Baillif S., Hartmann D., Freney J., Kodjikian L. (2010). Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du matériau. *Journal français d'ophtalmologie*. 33 : 210-221.
- Bayoudh S., Othmane A., Bettaieb F., Bakhrouf A., Ben Ouada H., Ponsonnet L. (2006). Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering*. 26:300-305.
- Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université aboubekr belkaid, Tlemcen.
- Beloin C., Roux A. et Svanborg C. (2008). *Echerichia coli*, biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322,249-289.
- Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J. (2003). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. 59(11): 3973-3977.
- Boutaleb N., Latrache H., Sire O. (2008) Interactions bactéries-matériaux dans les canalisations d'eau potable Role des propriétés physico-chimiques de surface sur le pouvoir d'adhésion.

- Boutaleb N. (2007). Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.
- Branger A., Richer M.M., Roustel S. (2007). Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
- Bruinsma G. M., Van der Mei H. C., Busscher H. J. (2001). Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 22:3217-3224.

C

- Campanac C. (2002). Biofilms bactériens : intérêts dans l'évaluation de l'activité détergente. Approche des facteurs impliqués dans la formation et la résistance finale. Thèse de l'université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Chalvet de Rochemonteix A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.
- Characklis W.G., Marshall K.C. (1990). Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York , N.Y.
- Clutterbuck A.L., Woods E.J. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine.
- Cohen Y. (2002). Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int. Microbial*. 5, 189-193.
- Coker C, Poore CA, Li X, Mobley HL (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection* ;2:1497-1505. PMID: 11099936.
- Costerton J.W. (2001). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *TRENDS in Microbiology*.9: 50-52.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.

D

- Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D'Orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J.Appl. Microbiol*. 104: 1552-1561.
- Dibonaventura G., Stepanovics S., Picciani C., Pompilio A., Piccolomini R.(2007).Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *FoliaMicrobiol*. 52, 86-90.
- Djordjevic D., Wiedmann M. And Mclands borough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and environment al microbiology*; Vol. 68, No. 6: 2950- 2958.

Références bibliographiques

- Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8, 9: 881– 890.
- Donlan R.M., Costerton J.W. (2002). Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 : 167- 193.
- Drzewiecka D. (2016). signifiante and roles of Proteus spp .bacteria in naturel environment .department of General microbiology institute microbiology biotechnology university of Lodz 90-237,Poland.
- Dumas C. (2007). Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

E

- Eleonora A. (2012).lipopolysaccharide (LPS) corebiosynthesis in *Proteus mirabilis*. Thèse de l'université de Barcelona faculté de pharmacie département de microbiologie et parasitologie.
- Espinasse F., Page B. et Cottard-Bouelle B.(2010).Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires* .426,51-63.

F

- Folkesson A., Haagensen J. A. J., Zampaloni C., Sternberg C. and Molin S. (2008). Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides. *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11.

G

- Gallardo-Moreno A.M., Gonzalez-Martin M.L., Pérez-Giraldo C., Garduno E., Bruque J.M., Gomez-Garcia A.C. (2002). Thermodynamic Analysis of Growth Temperature Dependence in the Adhesion of *Candida parapsilosis* to Polystyrene. *Applied and Environmental microbiology*. 68: 2610-2613.
- Goller C.C., Romeo T. (2008). Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top.Microbiol. Immunol.* 322: 37- 66.
- Gus G. (2015). Proteus Infections.

H

- Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. (2004).Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and

- electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*. 54:213-225.
- Hamadi F., Latrache H., Mabrouki M., Elghmari A., Outzourhit A., Ellouali M. et Chtaini A. (2012). Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 19:1, 73-85, DOI: 10.1163/1568561053066891.
 - Harjai K., Khandwaha R.K., Mittal R., Yadav V., GUPTA Gupta V., SHARMA S.(2005). Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol.* 50, 99–102 .
 - Hatt J.K., Rather P.N. (2008). Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Curr Top.*
 - Høiby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z. J., Moser C., Jensen P. and Bjarnsholt T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms, *International Journal of Oral Sciences*, Vol. 3 No. 2, pp. 55-65.
 - Holling N. (2014). Elucidating the genetic basis for catheter blockage and encrustation in *Proteus mirabilis*. Thèse Pour le Doctorat en philosophie. Université de Brighton Angleterre.
 - Holmes B., Costas M. and Wood A.C. (2008). "Typing of *Proteus mirabilis* from clinical sources by computerized analysis of electrophoretic protein patterns." *Pub Med*. Nov. 1991. NCBI. 21 Nov. 2008.
 - Hostacka A., Ciznar I.(2007). Biofilms formation and response to oxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* non-O1 depending on culture media. *Epidemiol.Mikrobiol.Imunol.* 56, 186–190.
 - Hostacka A., Ciznar I., Stefkovicova M.(2009). Temperature and pH Affect the Production of Bacterial Biofilm .Slovak Medical University, 833 03 Bratislava, Slovak Republic. *Regional Institute of Public Health, Trenčín, Slovak Republik.*

J

- Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley M.L. et Shilliff M.E.(2008). Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* .21,26-59.
- Joly B. et Reynaud A. (2002). Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. *Ed TEC & DOC et Ed médicales Inter Nationales*. Paris. 356P.
- Joshi P., Wadhvani T., Bahale P. and Kothari V. (2010). Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing, *The IUP Journal of Life Sciences*. Vol. 4 No. 1, pp. 59-72.

K

- Kaplan J.B. (2010). Biofilm dispersal : mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J DENT RES* 89,205_218.
- Kara Terki I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de *staphylocoques* isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Klein G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale, Bretagne.

L

- Le Minor L., Richard C. (1993) . Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries -*Institut pasteur*, publication 1993.
- Liesse L., Jean M.(2012).Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique .Thèse de doctorat.Université libre de Bruxelles.

M

- M'Hamedi I. (2015) Evaluation de la formation de biofilms des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées de dispositifs médicaux au CHU de Tlemcen .Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Mahamata B, J.P. Lavignec D. N. Bouzigesc D. J.P. Daurès B, A. Sottob. (2006) .Profils de résistance des souches urinaires de *Proteus mirabilis* de 1999 à 2005 au CHU de Nîmes. *Pathologie Biologie* 54 (2006) 456–461.
- Manos J., Belas R. (2006). The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* Prokaryotes 6:245–269 DOI: 10.1007/0-387-30746-x12. Chapitre 3.3.12.
- Marchal M. (2010).Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat .Université de Strasbourg, France.
- McQueary C.N., Actis L.A. (2011). *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *The Journal of Microbiology*. 49: 243-250.
- Mobley H. L., and Warren J.W.(1987). "Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters." *J ClinMicrobiol*25 (11):2216-7.
- Muller A. et Guaguere E. (2014).L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. Conflits AFVAC. Médecine interne / maladies infectieuses. Paris - la Défens.

- Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*; Vol. 12: 789–796.
- Myriam A. (2012). formation de biofilm in vitro par les souches Cliniques d'*Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université NANTES faculté de pharmacie.

N

- Nobbs A. H., Lamont R. J. and Jenkinson H. (2009), *Streptococcus* adherence and colonization, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 73 No. 3, pp. 407-505.

P

- Palmer J., Flint S., Brooks J.(2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* . 34 (9): 577-88.
- Pearson M.M *et al.* (2008). "Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility.", *J Bacteriol.* 190 (11): 4027-37).
- Pecastaings S. (2010). Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- Phillips P.L., Wollcot R.D., Fletcher J., Schultz G.S. (2010). Biofilms Made Easy. *Wounds International*.
- Pilet C., Bourdon J.L., Toma B., Marchal N., Balbastre C. (1979). Les entérobactéries Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne Doins, Paris, 2^e ed 1979: 109-187.

R

- Rosenberg M. (1984). Bacterial adherence to hydrocarbons : a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 22:289-295.
- Roux A. et Chigo J.M. (2006). Les biofilms bactériens. *Communication, Bull. Acad. Vêt*, 261-268.

S

- Sausserieau E. (2013). Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Thèse de doctorat d'Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.
- Singleton P. (2004). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6^e édition DUNOD.
- Sougakoff W., Trystram D. (2003). Résistances aux β -lactamines. Université Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. p. 31-46.
- Squinazi F. (2013). biofilm et matériaux des réseaux intérieurs de distribution de l'eau.
- Stichler D.J. (2009). *Proteus mirabilis* biofilm formation and catheter design, Cardiff University, UK.
- Stickler D., Ganderton L., King J., Nettleton J., Winters C. (1993). *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *School of Pure and Applied Biology*, University of Wales College of Cardiff, PO Box 915, Cardiff CF1 3TL, UK.

T

- Tenke P., Kovacs B., Jackel M. et Nagy E. (2006). The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* 24,13-20.
- Trautner B.W., Darouiche R. O. (2009). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, 32 (3), 177–183.

V

- Vu B., Chen M., Crawford R. J. and Ivanova E. P. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, *Molecules*, Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.

W

- Willey J., Sherwood L., Woolverton C. (2010). Microbiologie troisième édition chapitre 22 les bactéries : les protéobactéries page 557.

Y

- Yi K., Rasmussen A.W., Gudlavalleti S.K., Stephens D.S., Stojiljkovic I. (2004). Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 72: 6132-6138.

Annexes 1 : Préparation de solutions

➤ Cristal violet (1%)

Cristal violet..... 1 g
Eau distillée..... 100 ml

➤ Solution éthanol-acétone (75 : 25)

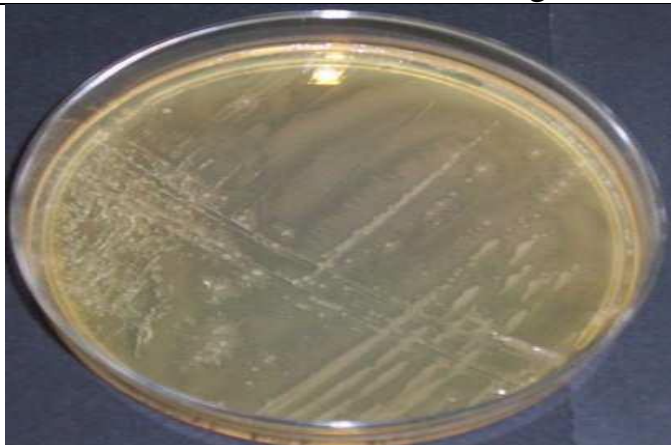
Ethanol.....75 ml
Acétone25 ml

➤ Solution PBS (pH : 7,4)

Nacl 8 g /l
Kcl 0.2 g/l
Na₂HPO₄1.44 g/l
KH₂PO₄0.24 g/l
Eau distillée.....1000 ml

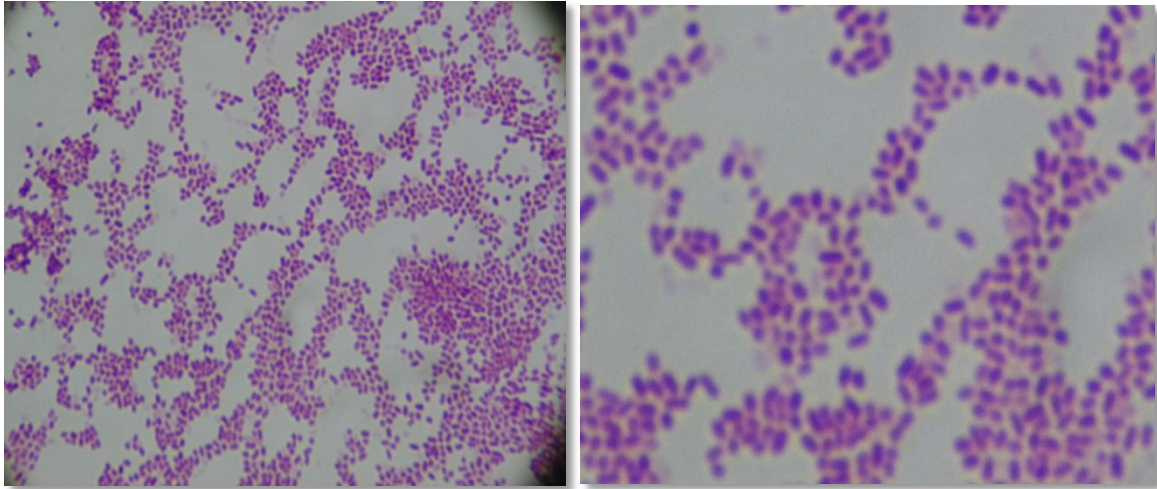
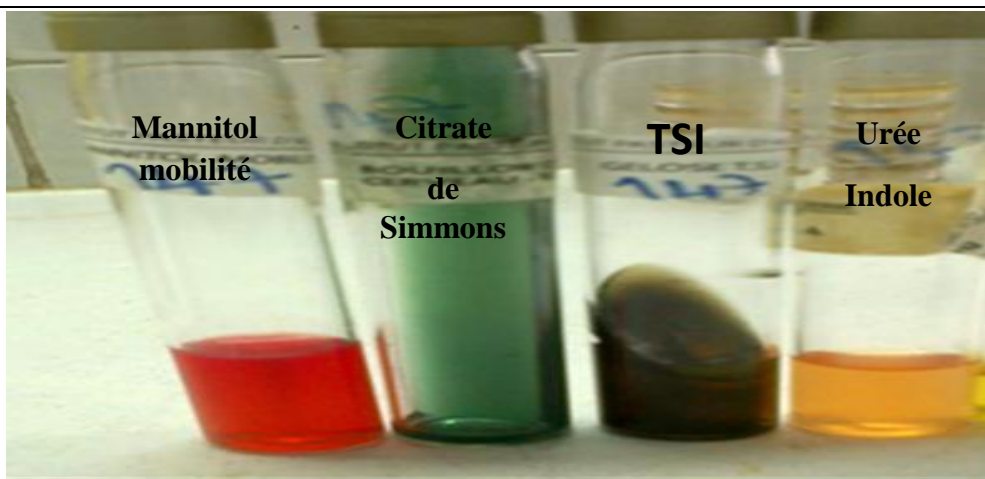
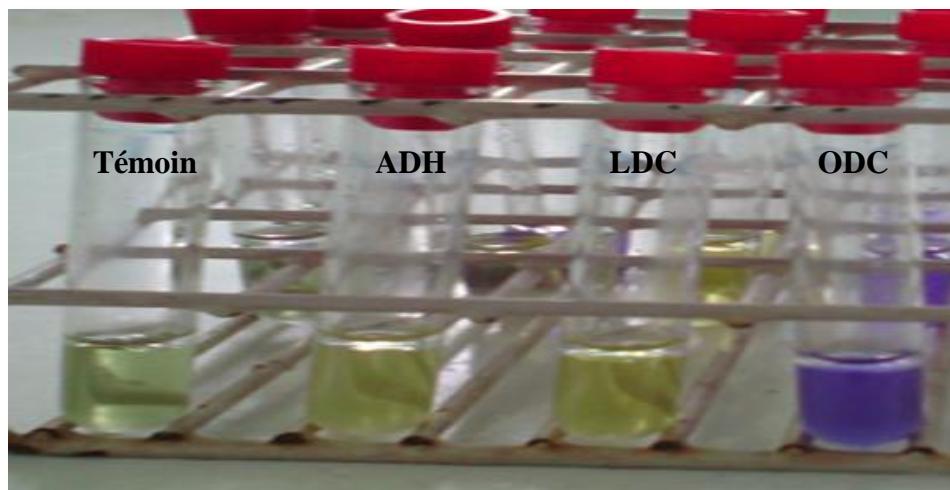
Annexes 2 : Résultats d'isolement et d'identification de *P. mirabilis*

Annexe 2.1. Culture de *P. mirabilis* sur gélose nutritive



Annexe 2.2. Culture de *P. mirabilis* sur gélose Héктоen



Annexe 2.3. Aspect microscopique des cellules de *P. mirabilis* (Grossissement 10X 100)**Annexe 2.4.** Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour les souches étudiées de *P. mirabilis*.**Annexe 2.5.** Résultat de teste de Recherche des décarboxylases: (LDC), (ODC) et (ADH).

Annexe 2.6. Résultats de la galerie biochimique API 20E obtenus pour les souches étudiées de *P. mirabilis*.

Avant l'incubation :



Après l'incubation :



Annexe 2.7. Tableau de lecture des résultats de la galerie Api 20 E			
Tests et réactifs	Réactions/enzymes	Résultats négatifs	Résultats positifs
ONPG	β -galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Arginine-dihydrolase	Jaune	Rouge/orange
LDC	Lysine-décarboxylase	Jaune	Rouge/orange
ODC	Ornithine decarboxylase	Jaune	Rouge/orange
CIT	Citrate utilisation	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/bleu
H₂S	H ₂ S production	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
TDA	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron-rougeâtre
IND	Indole production	Incolore Vert-pâle/jaune	Rose
VP VP 1+ VP 2 / 10 min	Acetoin production	Incolore	Rose/rouge
GEL	Gélatinase	Aucune diffusion	Diffusion du Pigment noir
GLU	Glucose fermentation/oxyda	Bleu / bleu-vert	Jaune/ jaune gris
MAN	Mannitol fermentation/oxydation		
INO	Inositol fermentation/oxydation		
SOR	Sorbitol fermentation/oxydation		
RHA	Rhamnose fermentation/oxydation	Bleu / bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose fermentation/oxydation		
MEL	Melibiose fermentation/oxydation		
AMY	Amygdalin fermentation/oxydation		
ARA	Arabinose fermentation/oxydation		

Annexes 3 : Antibiogramme de *P. mirabilis*

Annexe 3.1. Antibiogramme d'une souche de *P. mirabilis* (P3)



Annexe 3.2. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *P. mirabilis*

Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Diamètres critiques (mm)		
			R	I	S
Ticarcilline	TIC	75	≤ 13	14-16	≥17
Imipenème	IPM	10	≤19	20 - 22	≥23
Amoxicilline	AML	25	/	/	/
Céfazoline	KZ	30	≤19	20 - 22	≥23
Augmentin	AMC	30	/	/	/
Céfoxitine	FOX	30	≤14	15 - 17	≥18
Céfotaxime	CTX	30	≤22	23 - 25	≥26
Gentamycine	CN	10	≤12	13 - 14	≥15
Amikacine	AK	30	≤14	15 - 16	≥17
Acide nalidixique	AN	30	≤13	14 - 18	≥19
Sulfaméthoxazole / Triméthoprime	SXT	1.25/23.75	≤10	11 - 15	≥16
Chloramphénicol	C	30	≤12	13 - 17	≥18
Ciprofloxacine	CIP	05	≤15	16 - 20	≥21
Colistine	CT	/	/	/	/

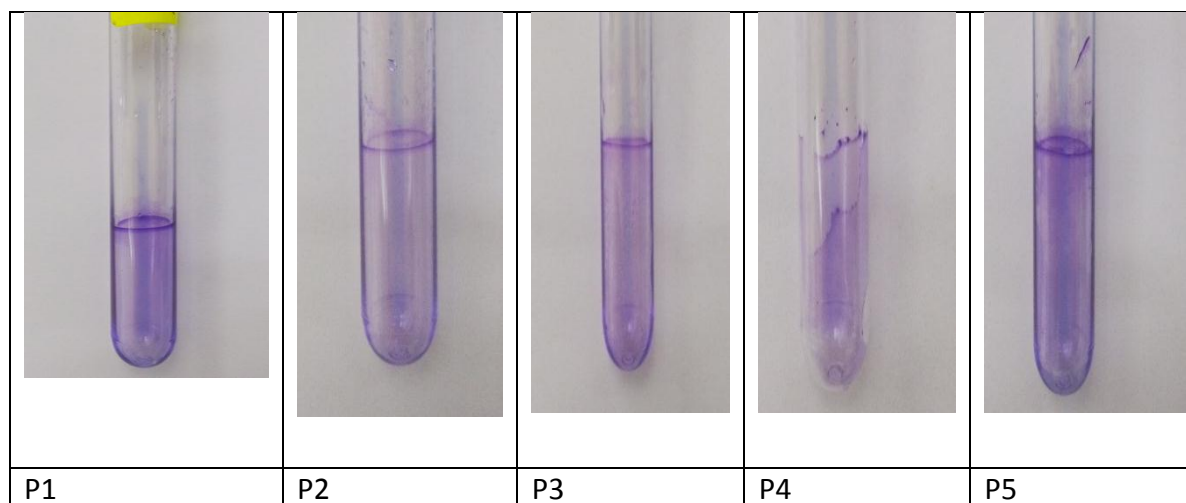
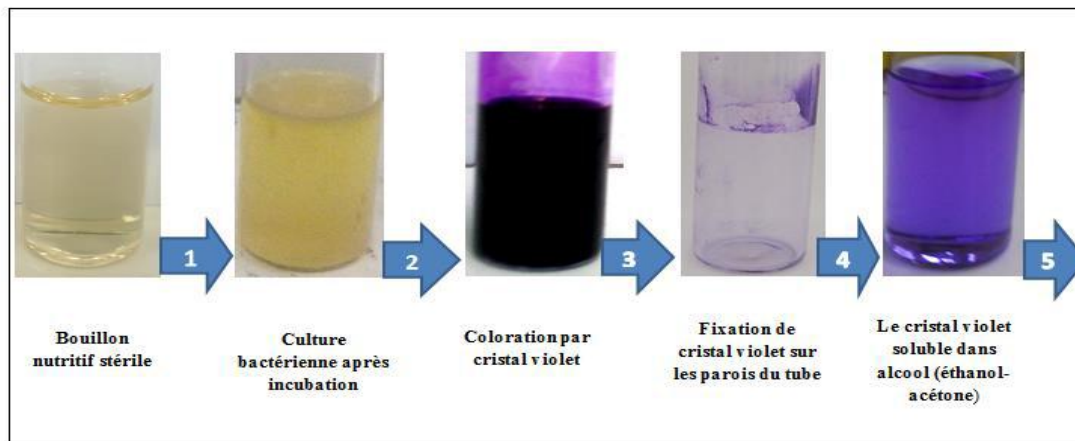
Tableau extrait du Document M100 – S23.Vol. 33, n°1. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; twenty-fourth informational supplement.

Extraits des recommandations 2011 du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie.

Annexe 4 : Résultats de la formation de biofilm








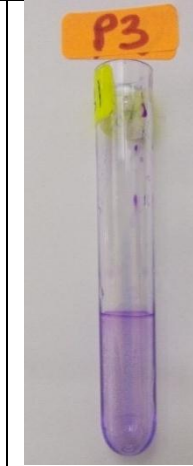







Annexe 4.1. Evaluation de la production de biofilm par la méthode CV

(1) Inoculation / Croissance, (2) Lavage 3 fois et coloration au CV, (3) Lavage jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes /égouttés et mis à sécher à l'air libre, (4) Solubilisation du CV fixé par un mélange d'éthanol-acétone 75 / 25 pendant une heure, (5) Quantification au spectrophotomètre.



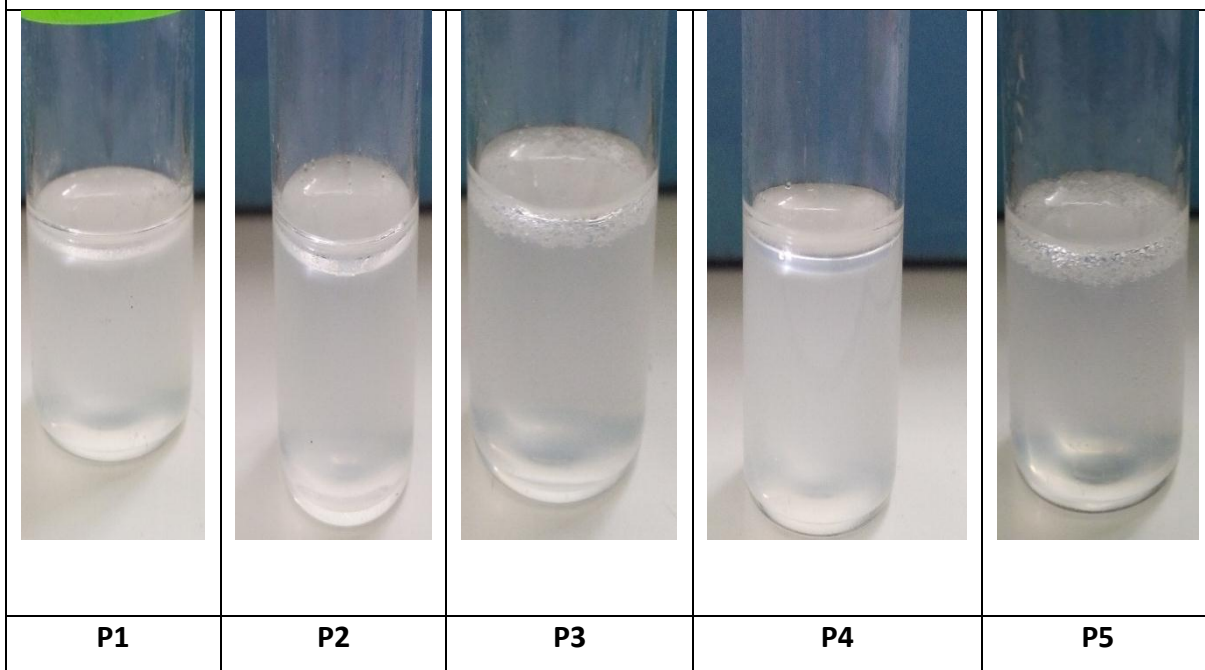
Détection de la formation de biofilm de *P.mirabilis* après coloration au CV

Annexe 5 : Résultats de l'étude de l'effet de pH sur la formation de biofilm

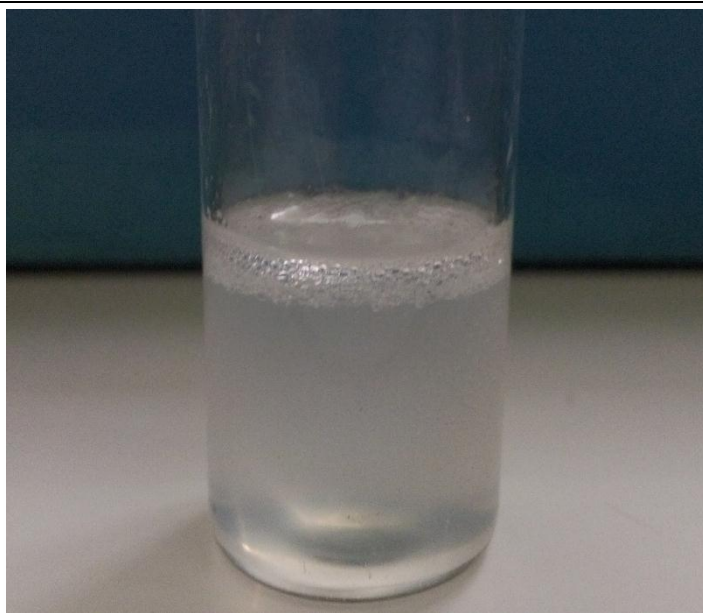
Les souches étudiées de <i>P. mirabilis</i>					
	P1	P2	P3	P4	P5
pH 5					
pH 7					
pH 9					

Annexe 6 : Résultats de l'étude de l'hydrophobicité de *P. mirabilis*

Séparation des deux phases : organique et aqueuse après décantation.



Séparation des deux phases : organique et aqueuse après décantation. (**P5**)



Résumé

Un biofilm est une communauté de micro-organismes adhérente à une surface vivante ou inerte. Ce biofilm semble être l'élément clé de nombreuses infections, et ceci pose de graves problèmes de santé publique.

Ce travail a pour objectif l'étude de l'influence de deux paramètres physicochimiques sur l'adhésion et la formation de biofilm par cinq souches cliniques de *P. mirabilis*, caractérisées par différents profils de résistance aux ATB, à savoir le pH du milieu de culture et l'hydrophobicité de surface cellulaire.

Cette étude a montré que toutes les souches étudiées ont la capacité d'adhérer au polystyrène. Ainsi, les proportions de cellules planctoniques et sessiles, de différentes souches, varient en fonction du pH de milieu de culture. Une grande variation a été aussi révélée entre les souches.

Par ailleurs, l'étude de l'hydrophobicité de surface cellulaire a révélé que quatre souches sont moyennement hydrophobes contre une souche hydrophobe. En effet, cette bactérie, semble exhiber un comportement semblable à celui d'autres bactéries pathogènes, qui expriment une corrélation directe entre l'hydrophobicité de leurs surfaces et la formation de biofilm.

Une meilleure compréhension des paramètres physico-chimiques pouvant influencer l'adhésion bactérienne devrait permettre de trouver des outils thérapeutiques capables de lutter contre les biofilms indésirables.

Mots-clés : *P. mirabilis*, infections à *P. mirabilis*, résistance aux ATB, biofilm, pH, hydrophobicité.

Summary

A biofilm is a community of microorganisms adhering to a living or inert surface.

This biofilm appears to be the key element of many infections, and this raises serious public health problems.

This work has for objective the study of the influence of two parameters physicochemical on adherence and biofilm formation by five clinical strains of *P.mirabilis*, characterized by different resistance patterns in the ATB, to know the pH of the culture medium and cell surface hydrophobicity.

This study has shown that all studied strains have the ability to adhere to polystyrene. Thus, the proportions of planktonic and sessile cells, of different strains, vary the pH of culture medium.

A large variation was also revealed between the strains.

In addition, the study of cell surface hydrophobicity revealed that four strains are moderately hydrophobic against a hydrophobic strain. This bacterium, seems to exhibit a behavior similar to that of other pathogenic bacteria, which express a direct correlation between hydrophobicity of their surfaces and biofilm formation.

A better understanding of the physicochemical parameters influencing bacterial adhesion expected to generate therapeutic tools capable of combating unwanted biofilms.

Key words: *P. mirabilis*, *P. mirabilis* infections, resistance to ATB, biofilm, pH, hydrophobicity.

ملخص

biofilm هو مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة تلتصق بسطح حيوي أو خامل. هذا الغشاء الحيوي هو العنصر الرئيسي للعديد من الإصابات، وهذا يثير مشاكل خطيرة في مجال الصحة العامة.

ويهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير عاملين فيزيائيين كيميائيين على الالتصاق وتشكيل الغشاء الحيوي لخمس سلالات سريرية لـ *P. mirabilis* التي تتميز بمختلف أنماط المقاومة للمضادات الحيوية، و لمعرفة درجة حموضة وسط الزرع و $I^{\prime}hydrophobicité$ لسطح الخلية.

وقد أظهرت هذه الدراسة أن جميع السلالات المختبرة لديها القدرة على الالتصاق على البوليسترين. وهكذا، فإن نسب العوالق والخلايا الملتصقة من سلالات مختلفة تختلف باختلاف درجة الحموضة وسط الزرع. كما كشف عن تباين كبير بين السلالات.

وعلاوة على ذلك، كشفت دراسة لـ $I^{\prime}hydrophobicité$ لسطح الخلية التي كانت أربع سلالات معتدلة $I^{\prime}hydrophobicité$ مقابل سلالة hydrophobe. وفي الواقع يبدو هذه البكتيريا تظهر سلوكا مشابها للبكتيريا الأخرى المسببة للأمراض الممرضة التي تعبر عن علاقة طردية بين $I^{\prime}hydrophobicité$ لسطح الخلية وتشكيل biofilm.

فهم أفضل للعوامل الفيزيائية والكيميائية التي تؤثر على التصاق البكتيريا من المتوقع أن تولد الأدوات العلاجية القادرة على مكافحة biofilms غير المرغوب فيها.

الكلمات المفتاحية :

P. mirabilis , عدوى *P. mirabilis* , المقاومة للمضادات الحيوية , biofilm , pH , $I^{\prime}hydrophobicité$.

Thème : L'influence des propriétés physicochimiques sur l'adhésion bactérienne.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes.

Résumé

Un biofilm est une communauté de micro-organismes adhérente à une surface vivante ou inerte. Ce biofilm semble être l'élément clé de nombreuses infections, et ceci pose de graves problèmes de santé publique.

Ce travail a pour objectif l'étude de l'influence de deux paramètres physicochimiques sur l'adhésion et la formation de biofilm par cinq souches cliniques de *P. mirabilis*, caractérisées par différents profils de résistance aux ATB, à savoir le pH du milieu de culture et l'hydrophobicité de surface cellulaire.

Cette étude a montré que toutes les souches étudiées ont la capacité d'adhérer au polystyrène. Ainsi, les proportions de cellules planctoniques et sessiles, de différentes souches, varient en fonction du pH de milieu de culture. Une grande variation a été aussi révélée entre les souches.

Par ailleurs, l'étude de l'hydrophobicité de surface cellulaire a révélé que quatre souches sont moyennement hydrophobes contre une souche hydrophobe. En effet, cette bactérie, semble exhiber un comportement semblable à celui d'autres bactéries pathogènes, qui expriment une corrélation directe entre l'hydrophobicité de leurs surfaces et la formation de biofilm.

Une meilleure compréhension des paramètres physico-chimiques pouvant influencer l'adhésion bactérienne devrait permettre de trouver des outils thérapeutiques capables de lutter contre les biofilms indésirables.

Mots clés : *P. mirabilis*, infections à *P. mirabilis*, résistance aux ATB, biofilm, pH, hydrophobicité.

Lieu du travail :

Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine.
Laboratoire de Microbiologie (RDC), Faculté de Science de la Nature et de la Vie.

Jury d'évaluation :

Président du jury : MERGOUD Lilia (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).
Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).
Examineur : ABDELAZIZ Ouided (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Date de soutenance : 19/06/2016