



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 الاخوة 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 : Biologie moléculaire des microorganismes

Intitulé :

Effet du Fer sur la formation de Biofilms bactériens

Présenté et soutenu par : *SEDRATI safia*

Le : 01/07/2019

HADJEZ meriem

Jury d'évaluation :

Président du jury : *ABDELAZIZ wided* (MCB - UFM Constantine).

Rapporteur : *BOUCHLOUKH warda* (MAA - UFM Constantine).

Examineur : *MERGOUD lilia* (MAA-UFM Constantine).

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et
miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir
Ce modeste travail.*

*En seconde lieu, nous tenons à remercier notre cher encadreur Mlle
Bouchloukh Warda (MAA-UFM Constantine)*

*Maître assistante à l'UFM Constantine pour ses précieux conseils sa
confiance et son aide*

Durant toute la période du travail.

*Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par
Abdelaziz Wided (MCB-UFM Constantine)*

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

*A Mme **Mergoud Lilia (MAA-UFM Constantine)***

D'avoir accepté d'examiner

Ce modeste travail.

*Nos profonds remerciements vont également à tous les enseignants qui
nous ont donné*

*Les bases de la recherche pendant les cinq ans et les Personnes qui
nous ont aidé et contribué,*

De près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Dieu tout puissant merci d'être toujours auprès de moi

Je dédie ce travail à :

A ma chère mère,

A mon cher père,

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières
à mon égard, de me soutenir et de m'épauler
pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

A mon frère, Mossaab

A ma sœur, Meriem

*Pour ses soutiens moral et leurs conseils
précieux tout au long de mes études.*

A ma chère grande mère

A Qui je souhaite une bonne santé

A ma chère binôme, Meriem

Pour son entente et sa sympathie

A mon très cher fiancé

*Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles
et pour leur encouragement.*

Dédicaces

Dieu tout puissant merci d'être toujours auprès de moi

Je dédie ce travail à :

A mes chers parents :

Hadjez embarek et Hadjez rokia,

*Je n'oublie jamais vos sacrifices exprimés
mon égard, votre attention corrective et votre
dévouement pour mon éducation.*

A mes chères sœurs :

Boutheina et Lina et Nessrine

*Pour leurs encouragements et leurs
Compréhensive*

Et A mon cher frère,Abdenmour

À mes chères amies :

Pour tous les moments que nous avons partagés.

A mon binôme Sedrati safia

pour son entente et sa sympathie

*Et A tous les membres de nos
familles.*

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Partie I : synthèse bibliographique	
Chapitre1 : Généralités sur les biofilms	2
1. Historique	2
2. Définition d'un biofilm	3
3. Les étapes de formation d'un biofilm	3
3.1. Conditionnement de la surface	3
3.2. Transport de la bactérie vers son support	4
3.3. Adhésion	4
3.3.1. Adhésion réversible.....	4
3.3.2. Adhésion irréversible	4
3.4. Croissance et développement du biofilm.....	5
3.5. Le détachement de bactéries	5
4. Composition et organisation.....	6
4.1. Composition	6
4.1.1. Les microorganismes	6
4.1.2. La matrice	7
4.2. Organisation	8
5. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	8
5.1. Caractéristiques de la surface.....	8
5.1.1. Rugosité de la surface	8
5.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface	8
5.1.3. Présence de films protéiques sur la surface	9
5.2. Caractéristiques du milieu	9
5.3. Propriétés des cellules	10
6. Le quorum sensing.....	10
7. Transfert d'information génétique au sein du biofilm	11

8. Les impacts du biofilm.....	11
8.1. Rôle négatif.....	11
8.1.1. En médecine	12
8.1.2. Dans l'agroalimentaire	12
8.1.3. Dans le traitement de l'eau potable.....	12
8.1.4. Dans l'industrie pétrolière	12
8.1.5. En milieu marin	13
8.2. Rôle positif.....	13
8.2.1. Dans le domaine agroalimentaire	13
8.2.2. Dans l'environnement	13
Chapitre 2 : Le fer et les bactéries	14
1. Définition	14
2. Les sources de fer dans l'environnement bactérien.....	14
2.1. Sources de fer libres	14
2.2. Sources de fer complexes	15
2.2.1. La transferrine et la lactoferrine.....	15
2.2.2. L'hème et les hémoprotéines	15
2.2.3. L'albumine	16
2.2.4. L'hémopexine	16
2.3. Autres sources de fer	17
2.3.1. Les sidérophores	17
2.3.2. Ferritines de l'hôte	18
2.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> comme source de fer	18
3. Régulation de l'homéostasie du fer	19
3.1. Acquisition du fer chez les bactéries à Gram négatif.....	19
3.2. Mécanismes de transport du fer chez les bactéries à Gram négatif	20
3.3. Mécanisme de transport du fer chez les bactéries a Gram positif.....	20
4. Influence du fer sur la formation des biofilms bactérien	21
Partie II :Partie pratique	
Chapitre 1 : Matériel et méthodes	23
1. Souches bactériennes	23

2. Etude de l'effet du fer sur la formation de biofilms	24
2.1. Préparation des suspensions bactériennes initiales	25
2.2. Test de formation de biofilms en tubes	25
2.3. Lecture	25
3. Traitement statistique des résultats	25
Chapitre 2 : Résultats et discussion	27
1. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	27
2. Effet du fer sur la formation de biofilms	28
2.1. Effet du fer sur la formation de biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.1.1. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.1.2. Effet du fer sur l'adhésion des cellules sessiles de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.2. Effet du fer sur la formation de biofilms de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
2.2.1. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
2.2.2. Effet du fer sur l'adhésion des cellules sessiles de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Conclusion	36
Références bibliographiques	37
Annexes	
Résumé	
Abstract	
الملخص	

Liste des abréviations

ABC : *ATP Binding Cassette*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALB : Albumine

ATB : Antibiotiques

CO₂ : Dioxyde de carbone

CV : Cristal Violet

DFO : desferrioxamine

DO : Densité optique

ED : Eau distillée

EDTA : Ethylène-diamine-tétra-acétique

EPS : Exopolysaccharides

ET : Ecart Type

Fe : Fer

FeCl₃ : Chlorure de Fer

Feo ABC : *Ferrous iron transport ATP Binding Cassette*

FK : Fibrose kystique

Ga³⁺ : ion gallium

GTP ase : Guanosine Triphosphatase

HB : Hémoglobine

HP : Haptoglobine

HPX : Hémoexine

KDA : Kilo Dalton

LB : Luria-Bertani

LF : Lactoferrine

LPS : Lipopolysaccharides

Lpx TG : Leucine, proline, n'importe acide aminé x, Thréonine and Glycine

μM : Micromole

M : Molaire

MOY : Moyenne

O₂ : Oxygène

P : Probabilité

PA : *Pseudomonas aeruginosa*

PH : Potentiel hydrogène

QS : *Quorum sensing*

SA : *Staphylococcus aureus*

TF : Transferrine

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes de la formation d'un biofilm.	06
Figure 2 : Image en microscopie confocale d'un biofilm bactérien mixte	07
Figure 3 : Exemples représentatifs de sidérophores microbiens et de phytosidérophores	18
Figure 4 : L'interférence avec l'acquisition de fer inhibe la formation de biofilm bactérien.	22
Figure 5. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de <i>P. aeruginosa</i>	29
Figure 6 . Effet des différentes concentrations en fer (FeCl_3) sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	30
Figure 7. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de <i>S. aureus</i>	32
Figure 8. Effet des différentes concentrations en fer (FeCl_3) sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i>	34

Liste des tableaux

Tableau 1. Antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Tableau 2. Antibiotiques testés sur <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Tableau 3. Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Tableau 4. Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Tableau 5. Effet du FeCl ₃ sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	30
Tableau 6. Effet du FeCl ₃ sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i>	33

Introduction

La plupart des bactéries favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre dans le milieu environnemental (état planctonique). L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement. Après attachement, les bactéries vont mettre en place et développer un biofilm (**Filloux et Vallet, 2003 ; Oliveira et al., 2015 ; Lee and Yoon, 2017**).

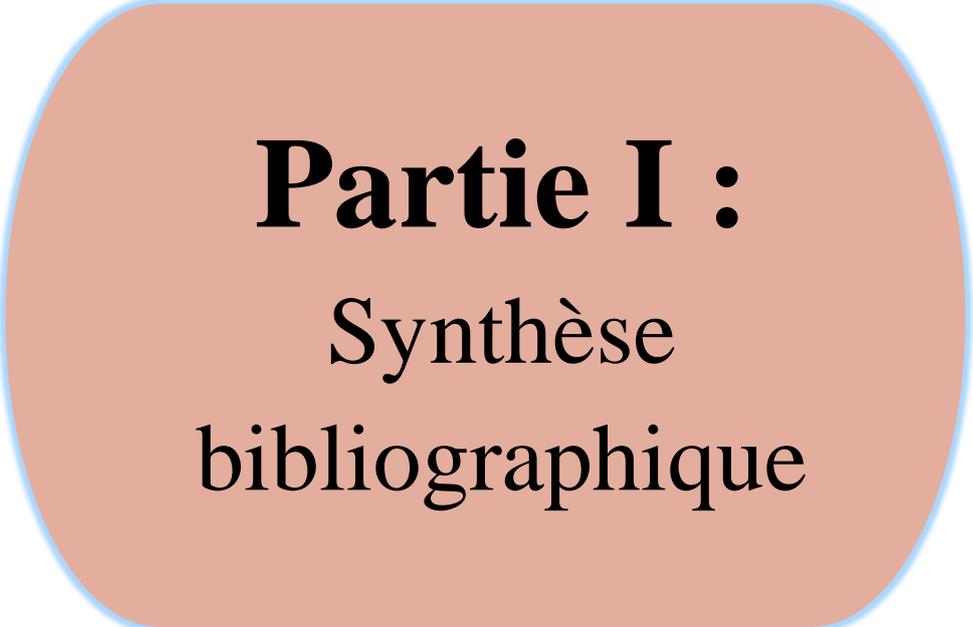
Les biofilms sont omniprésents dans l'environnement et influencent énormément notre vie de manière positive et négative. Ils présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques. Dans le milieu médical, leur importance est capitale, puisque 65% des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms. Malheureusement, ces infections sont d'autant plus difficiles à combattre que les bactéries associées en biofilm sont résistantes aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte (**Filloux et Vallet, 2003 ; Fux et al., 2004 ; Lopez et al., 2010 ; Oliveira et al., 2015 ; Lee and Yoon, 2017**).

La majorité des espèces bactériennes étudiées en laboratoire forment des biofilms. Parmi les bactéries modèles les plus étudiées ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (**Roux et Ghigo, 2006**).

P. aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste qui produit des biofilms robustes. Ces biofilms provoquent des infections nosocomiales graves, essentiellement chez les patients immunodéprimés, y compris ceux atteints de fibrose kystique. *S. aureus*, une bactérie à Gram positif, est également impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales. Les patients à risque de contracter des infections à *S. aureus* sont ceux qui possèdent des dispositifs médicaux à demeure. Cette bactérie peut les coloniser sous forme d'un biofilm (**Roux et Ghigo, 2006 ; Johnson et al., 2008 ; Dufour et al., 2015 ; Lee and Yoon, 2017**).

L'organisme hôte et les bactéries pathogènes ont besoin du fer pour leurs processus cellulaires. Le fer est devenu un sujet important dans le contexte de la pathogénèse bactérienne. La formation de biofilms est un processus complexe régulé par de nombreux signaux environnementaux. Outre les autres nutriments, le fer peut également réguler la formation de biofilms. Cette régulation, dépendante du fer, varie selon les espèces bactériennes (**Wu and Outten, 2008 ; Kang and Kirienko, 2018**).

Dans ce contexte, l'objectif de ce présent travail vise à étudier l'influence du fer sur l'adhésion et la formation de biofilms chez deux souches cliniques à savoir *P. aeruginosa* et *S. aureus*.



Partie I :
Synthèse
bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les biofilms

1. Historique

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, qui observa vers **1683** avec cet appareil des communautés de microorganismes à la surface des dents (**Costerton, 2004**).

En 1933, lors d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium, Henrici observa, fixées sur ces lames, des communautés bactériennes. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieux aqueux sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface, et non pas sous forme planctonique. Le concept de « biofilm » est né, mais le terme en lui-même n'est pas encore utilisé (**Costerton, 2004**).

Claude E. Zobell, considéré comme le père de la microbiologie marine, démontra vers 1936 que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué (**Costerton, 2004**).

En 1943, Zobell a déclaré que « l'eau de mer environnante contient moins de bactéries que celle qui se trouve à la surface » (**Jamal et al. 2018**).

En 1972, Wuhrmann, a indiqué que 90 à 99% des microorganismes existent sous une forme d'agglomérats à 1.5 m de profondeur dans les rivières, Le nombre de bactéries attachées sur les surfaces immergées dans un milieu aquatique est estimé être entre 1000 et 10000 fois plus grand que le nombre de bactéries libres dites : planctonique (**Alnnasouri, 2010**).

Plus récemment, des observations microscopiques quantitatives démontrent que plus de 99,9% des microorganismes se développent sous forme de communautés agrégées "sessiles", c'est-à dire, attachée à une surface, plutôt que comme "planctoniques" ou flottant dans le milieu. Les microorganismes se fixent sur des surfaces (vivantes ou non vivantes), forment des « tapis » qui conduisent à la colonisation totale de la surface. Ces tapis bactériens constituent des « *biofilms* ». Cette notion a été proposée en **1976** par William Costerton. Depuis cette époque, les biofilms sont considérés comme le mode de vie normal des microorganismes (**Alnnasouri, 2010**).

Costerton *et al.* (1978) a proposé la première théorie des biofilms sur la base de l'observation de communautés microbiennes sessiles dans les torrents de montagne. De plus, de nombreuses études ont été effectuées pour comprendre ces systèmes vivants. Cependant, il

Il y a encore un manque de connaissances général sur la façon dont les biofilms se développent, changent et se détachent (**Andrade Pinho medeiros, 2016**).

En 2006, Allwood *et al.* ont annoncé dans le journal « Nature » que les stromatolithes, qui résultent de l'activité biologique de cyanobactéries, sont une forme de biofilm composés de microorganismes, et qu'ils ont été à l'origine de la création de structures de pierre depuis des milliards d'années. Ces « pierres vivantes » étaient, à cette époque, la source unique d'oxygène dans l'atmosphère et donc source de vie sur notre planète (**Alnasouri, 2010**).

2. Définition d'un biofilm

Les biofilms sont des communautés microbiennes attachées à des surfaces et enfermées dans une matrice extracellulaire d'origine microbienne. Ils représentent la forme prédominante de la vie microbienne. Le biofilm contient des cellules microbiennes adhérentes les unes aux autres et à une surface vivante ou inerte, il protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostile (**Dufour et al., 2010 ; Tremblay et al., 2014 ; Jamal et al., 2018**).

3. Les étapes de formation d'un biofilm

Les biofilms se forment progressivement au fil du temps. Il existe un cycle de croissance universel en cinq étapes d'un biofilm (**Figure 1**) ayant des caractéristiques communes indépendantes du phénotype des organismes (**Aparna et al., 2008**).

3.1. Conditionnement de la surface

La première étape est la formation du film conditionnant, il est composé de protéines ou des fragments protéiques, des glucides, des lipides et de matières minérales (comme les sels) issus du milieu environnant. La nature de film de conditionnement peut être très différente selon le type d'environnement auquel la surface du substrat est exposée, ce film modifie les propriétés physicochimiques de surface (tension de surface, polarité, caractère hydrophile/hydrophobe), ce qui a pour conséquence de favoriser ou d'inhiber l'adhésion bactérienne (**Branger, 2007 ; Lorite et al., 2011 ; Brauge, 2015**).

De plus, l'adsorption et l'accumulation de molécules organiques sur le support permettent une disponibilité en nutriment favorisant le chimiotaxisme et l'installation des microorganismes sur la surface (**Brauge, 2015**).

3.2. Transport de la bactérie vers son support

Après la formation du film primaire l'étape suivante correspond au transport des microorganismes à proximité de la surface, l'origine des microorganismes est soit le recrutement des bactéries de milieu soit d'un biofilm présent dans l'environnement et qui est en phase de dispersion (**Branger, 2007 ; Brauge, 2015**).

3.3. Adhésion

Suite à la phase de transport, l'étape d'adhésion « réversible » à lieu et elle est suivie d'une phase d'adhésion « irréversible » (**Brauge, 2015**).

3.3.1. Adhésion réversible

Au départ, les cellules microbiennes planctoniques se déplacent dans le milieu liquide par des forces physiques ou par les flagelles. Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface des forces attractives ou répulsives qui varient en fonction des niveaux de nutriments, du pH, de la force ionique et de la température interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface (**Roux and Ghigo, 2006 ; Garret et al., 2008 ; Banerjee et al., 2015**).

Les bactéries mobiles ont un avantage concurrentiel : elles utilisent des flagelles pour surmonter les forces hydrodynamiques et répulsives (**Garret et al., 2008**).

3.3.2. Adhésion irréversible

En temps réel, un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible restent immobilisées et deviennent adsorbées de manière irréversible (**Garret et al., 2008**).

Les forces nécessaires pour le détachement des cellules doivent être beaucoup plus importantes (grattage, ultrasons). Dans cette phase, cette notion « d'irréversibilité » est liée aux multiples points d'interaction conduisant à une liaison de forte énergie. L'hydrophobicité de surface, les appendices protéiques comme les pilis, les flagelles, ou les fimbriaes, et la composition et la proportion des exopolysaccharides (EPS), influencent à la fois la vitesse et l'importance de l'adhésion microbienne (**Garret et al., 2008 ; Brauge, 2015**).

Le passage entre la phase d'adhésion réversible et la phase d'adhésion irréversible serait très rapide (de la seconde à la minute) (**Garret et al., 2008 ; Brauge, 2015**).

3.4. Croissance et développement du biofilm

C'est l'étape clé de la formation du biofilm. Une fois que les cellules microbiennes sont fixées irréversiblement sur la surface, elles commencent à croître et à se multiplier pour former des micro-colonies (**Tremblay et al., 2014**).

Ces activités biologiques sont fonction de la carence ou l'abondance des facteurs essentiels tels que l'eau, la teneur en oxygène et de paramètres physicochimiques comme la température, le pH, la lumière, etc. Le nombre de cellules microbiennes augmente et donc la distance entre deux cellules diminue. Cela provoque la sécrétion d'exo-polymères qui contribuent à la forte adhésion des cellules les unes aux autres d'un côté et de l'ensemble à la surface d'un autre côté. Les microorganismes peuvent échanger des métabolites avec leurs voisins par des relations physiologiques (**Blenkinsopp et al., 1991**).

Il a été estimé que le biofilm mature ne contient que 10% ou moins de son poids sec sous forme de cellules. En général, lorsque le biofilm atteint une certaine épaisseur, les conditions à sa base deviennent anaérobies. Cela indique que le biofilm est proche d'un état de maturité, avec une grande diversité d'espèces (**Hamilton et al., 1985 ; Alnasouri, 2010**).

3.5. Le détachement de bactéries

L'étape finale de la formation d'un biofilm est le détachement et la dispersion de cellules bactériennes, ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm (**Tremblay et al., 2014**).

Le détachement des bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries, notamment par le quorum sensing. Lorsque la densité bactérienne sur une surface devient très élevée (10^7 cellules/cm), sous stress environnemental ou une carence nutritive, des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique (**Kaplan, 2010 ; Brauge, 2015**).

Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas ou fragments selon les mécanismes impliqués. Ainsi, un biofilm

établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Kaplan, 2010).

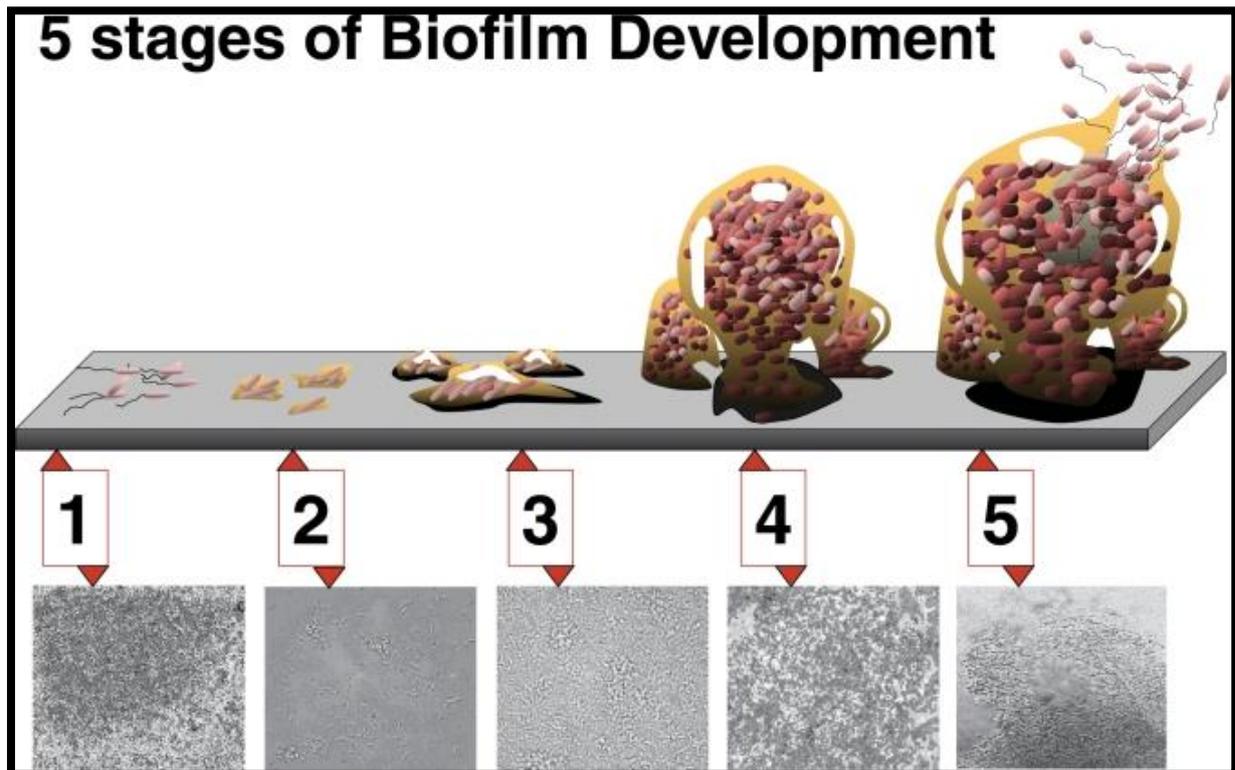


Figure 1 : Les étapes de la formation d'un biofilm et leur aspect microscopique (Monroe,2007).

4. Composition et organisation

4.1.Composition

Le biofilm est composé de microorganismes situés au sein d'une matrice. En règle générale, 5 à 35% du volume du biofilm est constitué de microorganismes, le volume restant étant constitué par la matrice extracellulaire (Branger, 2007 ; Jamal *et al.*, 2018).

4.1.1. Les microorganismes

Dans l'environnement, les biofilms sont essentiellement multi-espèces, c'est-à-dire qu'ils sont formés par nombreux types de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, mycètes (Figure 2). A l'inverse, les biofilms implantés sur les dispositifs médicaux par exemple, sont dans la majorité des cas, constitués par une seule espèce bactérienne, piégée dans une matrice composée d'EPS. Bien que les biofilms soient très étudiés, très peu d'études ont été réalisées sur les biofilms complexes (Branger, 2007 ;Portie, 2014).

Lors de leur formation, une compétition se met en place entre les différentes espèces, favorisant ou non la présence de certaines d'entre elles. Les bactéries interagissent alors entre elles et finissent par former des agrégats. Ainsi rassemblées, elles se protègent mutuellement

contre les stress environnementaux, ou la présence de composés toxiques comme les traitements antibactériens, les métaux, etc. (Branger, 2007 ;Portie, 2014).

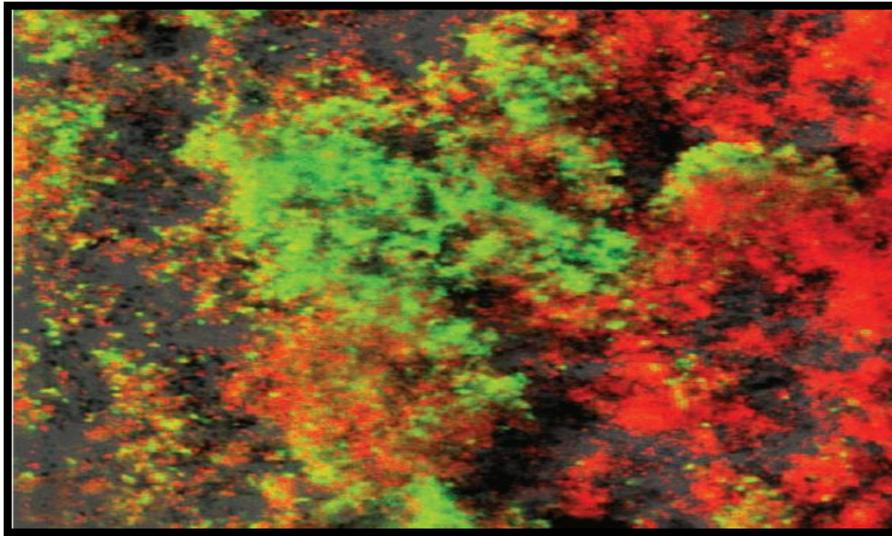


Figure 2 : Image en microscopie confocale d'un biofilm bactérien mixte (Filloux and Vallet, 2003).

4.1.2. La matrice

Une fois l'adhésion au support faite, les bactéries commencent à sécréter une matrice adhésive et protectrice appelée matrice extracellulaire. Cette dernière constitue une véritable barrière de protection pour les cellules bactériennes (Brauge, 2015).

Elle exerce différents rôles ; Elle assure la cohésion de chaque micro-colonie, les protège, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes. Elle fournit des nutriments dissous et élimine leurs déchets (Branger, 2007 ; Brauge, 2015).

Elle est composée de :

- L'eau : composant majoritaire de la matrice extracellulaire, peut représenter jusqu'à 97% du poids humide d'un biofilm.
- des nutriments, des métabolites, des produits de lyse cellulaire et tout autre détritit provenant du milieu environnant.
- Des polymères appelés aussi EPS, ils constituent l'élément structural majeur du biofilm dont ils peuvent représenter jusqu'à 85% de la masse totale, ils jouent un rôle essentiel dans l'architecture du biofilm. Ils sont responsables de la fixation du biofilm à la surface mais aussi de la cohésion de ce dernier. La nature des EPS peut considérablement varier selon les microorganismes et l'environnement dans lequel se développe le biofilm (Branger, 2007 ; Brauge, 2015 ; Jamal *et al.*, 2018).

4.2. Organisation

Les bactéries sont organisées au sein de la matrice sous forme de micro-colonies. Ces dernières sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets. Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'EPS et être utilisé par les bactéries (**Branger, 2007**).

Le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physico-chimiques. Ainsi, le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (**Roux and Ghigo, 2006**).

5. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (**Donlan and Costerton, 2002**).

5.1. Caractéristiques de la surface

5.1.1. Rugosité de la surface

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités. Néanmoins, certaines bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (**Characklis, 1990 ; Donlan and Costerton, 2002**).

5.1.2. 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 microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le plastique (sonde urinaire), que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outrepasser les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaisons hydrophobes (**Bendinger, 1993**).

5.1.3. Présence de films protéiques sur la surface

La présence de polymères sur un matériau 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 (Mittelman, 1996).

La nature de ces films protéiques est différente selon les milieux. Prenons l'exemple des bactéries formant le biofilm de la plaque dentaire. Elles se fixent sur un film protéique, présent à la surface de l'émail dentaire et composé d'albumine, de lysosymes, de glycoprotéines, de phosphoprotéines et de lipides (Donlan, 2008).

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, fibronectine, laminine (Goller and Romeo, 2008).

5.2. Caractéristiques du milieu

Le milieu dans lequel le biofilm se forme ou milieu environnant, conditionne également le processus. Parmi les facteurs les plus importants on peut citer les facteurs suivants :

- **La température.**
- **Le pH** : conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité.
- **Concentration** en oxygène.
- **L'osmolarité.**
- **Les sources de carbone disponibles** : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation.
- **Les concentrations en nutriments** : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm, ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique.
- **Les concentrations en certains cations** : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (Sodium Na^+ , Calcium Ca^{2+} , Ion ferrique Fe^{3+}) influence l'attachement de *Pseudomonas* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988 ; O'Toole *et al.* , 2000 ; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Goller and Romeo, 2008).

- **Hydrodynamique du fluide** : Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les microorganismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (**Donlan, 2002**).

5.3. Propriétés des cellules

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. La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharide (**Donlan, 2002**).

Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (Composants de certaines bactéries à Gram positif) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les EPS et les lipopolysaccharides (LPS) sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

6. Le quorum sensing

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de régulation tels que le Quorum-Sensing (QS). Il s'agit de mécanismes de contrôle au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, via des médiateurs chimiques, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception de densité cellulaire. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique. Une fois que les concentrations en molécules signaux atteignent une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (**Costerton 1999, Costerton et al., 1999 ; Tomlin et al., 2005 ; Irie and Parsek, 2008**).

Le QS régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, et en prenant en compte les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage de bactéries planctoniques à partir du biofilm (**Irie and Parsek, 2008**).

Le QS aurait aussi un rôle dans l'épaisseur du biofilm, il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme des protéases (Tomlin *et al.*, 2005 ; Clutterbuck *et al.*, 2007; Irie and Parsek, 2008).

Les molécules du QS jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme des protozoaires tels que *Serratia marcescens* (Queck *et al.*, 2006).

7. Transfert d'information génétique au sein du biofilm

Les biofilms sont souvent considérés comme des points chauds pour le transfert horizontal de gènes et fournissent un environnement particulièrement propice à la sélection de tels gènes. Jusqu'à présent trois mécanismes possibles étaient décrits dans ce phénomène : la transformation (incorporation d'ADN à partir de l'environnement), la transduction (transfert d'ADN par le biais d'un bactériophage), et la conjugaison (transfert de plasmides entre bactéries par l'intermédiaire d'un pilus sexuel) (Briandet *et al.*, 2012; Stalder and Top, 2016).

Le transfert horizontal d'information génétique est un moyen naturel, joue un rôle important dans l'évolution et la diversité génétique (acquisition des nouvelles propriétés) des communautés microbiennes (Roux and Ghigo, 2006 ; Briandet *et al.*, 2012).

La proximité physique des bactéries favorise le transfert horizontal de matériel permettant l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (ATB) ou d'autres caractères bénéfiques augmentant les chances de survie de la communauté (Lebeaux and Ghigo, 2012).

8. Les impacts du biofilm

Les biofilms peuvent avoir des effets positifs ou négatifs pour l'homme ou ses activités :

8.1. Rôle négatif

Malgré les procédures de nettoyage et de désinfection, les biofilms posent des problèmes divers :

8.1.1. En médecine

- Les biofilms peuvent entraîner de sévères problèmes de santé lorsqu'ils induisent l'apparition d'espèces pathogènes. 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 légèrement ou fortement immunodéprimés et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Costerton et al., 1999**). En plus, ces infections peuvent être liées au développement de biofilms sur dispositifs médicaux (**Flemming and Wingender, 2001**).
- 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 (**Lewis, 2001**).
- 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 and Costerton, 2002**).

8.1.1. Dans l'agroalimentaire

Le développement des biofilms dans les surfaces des équipements d'industries alimentaires (les réservoirs de stockage, les canalisations ...) peut induire la corrosion des surfaces métalliques alimentaires réduisant l'efficacité des appareils par diminution de transfert de chaleur dans les échangeurs thermiques (**Simoès et al ; 2010**).

8.1.2. Dans le traitement de l'eau potable

- La formation de biofilms dans les canalisations d'eau potable, en particulier par la bactérie *Legionella pneumophila*, est également un problème majeur car l'ajout de chlore ne permet pas d'éliminer les bactéries fixées (**Coester and Cloetel, 2005**).
- L'implantation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité de l'eau potable (contamination, mauvais goût) (**Block et al., 1993**).

8.1.3. Dans l'industrie pétrolière

- La colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable (**Coester and Cloetel, 2005**).

8.1.4. En milieu marin

- La formation des 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 (**Coester and Cloetel, 2005**).

8.2. Rôle positif

Les biofilms peuvent se révéler très utiles :

8.2.1. Dans le domaine agroalimentaire

- La production d'éthanol dans des réacteurs dans lesquels des levures de *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisées sous forme de biofilm a été décrite par plusieurs auteurs (**Chung and Park, 1983 ; Demirci et al., 1997 ; Todd and Gerald, 2001**).
- Les biofilms sont utilisés également dans la production du vinaigre (acide acétique) : un mode de fabrication utilise un réacteur dans lequel une solution alcoolique coule à travers un biofilm d'*Acetobacter* développé sur un lit de bois (**Bailey and Ollis, 1986**).
- Les réacteurs à biofilm ont également été utilisés dans la production d'ATB. Par exemple, un réacteur à biofilm à lit fluidisé a donné de meilleurs résultats lors de la production de Pénicilline (**Park and Wallis 1984**).

8.2.2. Dans l'environnement

- Les biofilms servent au traitement des déchets par un mécanisme appelé « Bioremédiation » (**Cohen, 2002**).

Chapitre 2 : Le fer et les bactéries

1. Définition

Parmi les éléments les plus abondants à la surface de notre planète, le fer constitue le quatrième élément (**Bartrand, 2009**).

Le fer est un nutriment essentiel à la croissance bactérienne et il est essentiel à la production d'énergie bactérienne, à la synthèse de nucléotides et à la régulation de l'expression des gènes. Les microorganismes nécessitent une concentration de 10^{-6} M de fer pour une croissance optimale. Afin de surmonter cette faible biodisponibilité du fer, de nombreux microorganismes produisent des sidérophores pour récupérer le Fe à partir de sources naturelles (**Hannauer, 2011 ; Lin et al., 2012 ; Rizzi et al., 2019**).

Malgré son rôle important dans les cellules microbiennes, la disponibilité de fer libre dans l'environnement est limitée en raison de l'oxydation du fer ferreux en ions ferriques qui précipitent près d'un pH neutre (**Hayrapetyan et al., 2016**).

Une autre caractéristique omniprésente des bactéries dans les environnements naturels est la formation de biofilm. Des études antérieures ont montré que le Fe externe influençait fortement la formation de biofilm chez plusieurs bactéries, suggérant que ce microenvironnement joue un rôle mécaniste dans l'acquisition des micronutriments pour les bactéries (**Hannauer, 2011 ; Rizzi et al., 2019**).

Le fer sert également de signal de stress qui régule la physiologie microbienne, comme la sensibilité aux ATB. La compétition entre l'hôte et les agents pathogènes pour des ressources limitées en fer peut déterminer le résultat de l'infection. De nombreux systèmes homéostatiques contrôlent ainsi étroitement la concentration de fer intracellulaire chez les bactéries afin de permettre une adaptation aux environnements en constante évolution (**Lin et al., 2016**).

2. Les sources de fer dans l'environnement bactérien

2.1. Sources de fer libres

Malgré sa forte abondance sur terre, le fer libre est très peu accessible biologiquement et n'est disponible qu'en conditions anaérobies ou réductrices (**Duhutrel, 2011**).

En conditions aérobies, le fer est présent majoritairement sous forme ferrique et se trouve minéralisé sous des formes très difficiles d'accès pour les bactéries, certaines bactéries

ont développé des systèmes de réductases extracellulaires. La réduction du Fe Ferrique en fer ferreux est une étape primordiale pour incorporer le fer dans les enzymes. Grâce à cette activité, le fer insoluble ou minéralisé pourrait constituer une source pour de nombreuses bactéries (**Duhutrel, 2012**).

2.2.Sources de fer complexes

2.2.1. La transferrine et la lactoferrine

La transferrine (Tf) et la lactoferrine (Lf) sont deux glycoprotéines monomériques, leur poids moléculaire est d'environ 80 kDa. La transferrine est présente dans le sérum et la lactoferrine dans la lymphe et les sécrétions muqueuses. Ces protéines présentent une très forte affinité pour le fer ferrique (**Meksem, 2010**).

La lactoferrine appartient à la famille des transferrines, mais contrairement à la transferrine, qui a un rôle clé de transporteur du fer, la lactoferrine est considérée comme un simple chélateur de fer protégeant ainsi contre les infections bactériennes par le biais de sa capacité à leurs enlever du fer nécessaire à leur croissance. De même, elle est utilisée comme un agent antibactérien en thérapeutique humaine et est utilisée pour limiter la contamination bactérienne sur la viande aux Etats-Unis (**Pierce et al., 2009 ; Duhutrel, 2011**).

La transferrine est une protéine du sérum, capables de lier, de transporter, et libérer une variété de métaux. Ses intérêts les plus particuliers sont les propriétés de liaison et de libération du fer (**Halbrooks et al., 2004**). Elle possède deux sites de fixation du fer qui semblent posséder des rôles fonctionnels distincts, le site «a» est plutôt associé à la fixation du fer à bas pH et il est localisé dans la région NH terminale, le site «b» est localisé dans la région C-terminale et fixe le fer à des valeurs de pH neutres ou physiologiques (**Duhutrel, 2011**).

2.2.2. L'hème et les hémoprotéines

- **L'hème** : L'hème est une molécule, issue de l'association d'une protoporphyrine et d'un atome de Fe^{2+} . *In vitro*, l'hème s'oxyde facilement en hémine (**Meksem, 2010**).

L'hème constitue le groupement prosthétique des apohémoprotéines impliquées dans des processus métaboliques très variés, devenant ainsi des hémoprotéines actives. Par conséquent, la fonction de l'hème dépendra des protéines auxquelles il se lie. L'hème peut représenter pour les bactéries soit une source de fer et de porphyrine pour des espèces comme : *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, ou *Haemophilus influenzae*, soit uniquement une source de porphyrine comme chez l'espèce *Lactococcus lactis* (**Meksem, 2010**).

- **Les hémoprotéines** : Dans les systèmes biologiques, la quasi-totalité de l'hème est associée aux hémoprotéines comme l'hémoglobine ou la myoglobine qui peut constituer elles-mêmes des sources de fer et/ou de porphyrine pour les bactéries :
 - **L'hémoglobine** : L'hémoglobine (Hb) est la principale protéine des globules rouges assurant le transport de l'oxygène (O₂) du poumon vers les tissus et le retour du gaz carbonique (CO₂) des tissus vers le poumon. Sa structure oligomérique permet une régulation fine par l'O₂ lui-même (effet allostérique) et par le pH et le 2,3-diphosphoglycérate. Le fer (Fe²⁺) de la molécule d'hème portée par les chaînes de globine constitutives de l'hémoglobine assure la liaison de l'O₂ (**Baudin, 2016**).

L'hémoglobine, ajoutée dans un milieu déplétée en fer, est suffisante comme seule source de fer pour supporter la croissance de bactéries comme *Yersinia pestis* ou *Neisseria meningitidis* (**Duhurtel, 2011**).
 - **L'haptoglobine** : L' (Hp) est une protéine plasmatique humaine abondante qui capture étroitement l'pendant l'hémolyse. Le complexe haptoglobine-hémoglobine constitue une source de fer pour plusieurs bactéries comme *Haemophilus influenzae* (**Meksem, 2010 ; Andersen et al., 2017**).

2.2.3. L'albumine

L'albumine (Alb) est une protéine constituant plus de la moitié des protéines sériques de l'organisme. Elle possède de nombreuses propriétés physiologiques, incluant en particulier une fonction de transport de nombreuses particules endogènes et exogènes et de médicaments, mais aussi une action anti-inflammatoire, anti-oxydante, anti-coagulante et anti-agrégante plaquettaire. Elle joue parallèlement un rôle essentiel dans les échanges liquidiens transmembranaires entre les secteurs intravasculaire et interstitiel (**Arques, 2018**).

En absence d'études qui montrent la présence de récepteurs spécifiques pour l'albumine chez les bactéries, il est très probable que l'hème lié à l'albumine soit reconnu par les récepteurs de l'hème permettant son transfert passif de l'albumine (**Meksem, 2010**).

2.2.4. L'hémopexine

L'hémopexine (Hpx) est une glycoprotéine plasmatique formée de deux domaines similaires, l'hème se lie à l'interface des deux domaines. Plusieurs bactéries sont capables d'utiliser le complexe hème-hémopexine comme par exemple *Haemophilus influenzae*.

Cependant, il n'existe pas d'études montrant une utilisation directe et spécifique de ce complexe par les bactéries (Meksem, 2010).

L'hémopexine constitue une source de fer pour certaines bactéries comme *H. influenzae* (Duhutrel, 2011).

2.3. Autres sources de fer

2.3.1. Les sidérophores

Les sidérophores sont définis comme des molécules de faible poids moléculaires, ayant une forte affinité pour le fer ferrique, produits par une grande variété de microorganismes (bactéries et champignons) et par certaines plantes (phytosidérophores des graminées), qui se développe dans des conditions de faible teneur en fer (Neilands, 1995 ; Bartrand, 2009 ; Vulont and Schalk, 2015 ; Hayrapetyan *et al.*, 2016).

Certaines bactéries ne produisent pas de sidérophores mais se servent de ces produits par d'autres espèces comme c'est le cas pour *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fragi* ou encore *S. aureus*. Cette dernière espèce est ainsi capable à la fois de produire les sidérophores et d'utiliser ces produits par d'autres espèces et d'utiliser ces produits par d'autres espèces (Duhutrel, 2012).

Les microorganismes produisent une large gamme de sidérophores (Figure 3). La plupart des sidérophores bactériens sont des catécholates (à savoir l'entérobactine) et certains sont des carboxylates (à savoir la rhizobactine) et des hydroxamates (à savoir la ferrioxamine B). Cependant, certains types de sidérophores bactériens contiennent un mélange des principaux groupes fonctionnels (par exemple, la pyoverdine). Les hydroxamates appartenant à la famille des ferrichromes (c.-à-d. Ferrichrome) sont l'un des sidérophores fongiques les plus courants. Ils sont ensuite divisés en cinq groupes, en fonction de la chaîne latérale de la fonction hydroxamate (Ahmed and Holmström, 2014).

Les sidérophores, peuvent également être considérés comme des facteurs de virulence :

- Premièrement, les sidérophores permettent au champignon de mieux survivre en captant le fer dans les tissus de l'hôte qui en ont une très faible teneur.
- Deuxièmement, leur capacité à former des complexes stables avec le fer (III) leur confère un rôle perturbateur dans le métabolisme du fer de l'hôte, d'autant que les complexes ferrisidérophores sont généralement plus stables que les complexes ferprotéine. En effet, il a été démontré chez *Aspergillus fumigatus* et *S. aureus* que les sidérophores entrent en compétition avec la transferrine de l'hôte pour la complexation du fer.

- Troisièmement, les sidérophores microbiens peuvent soustraire le fer inclus dans la transferrine qui assure le transport du fer dans le sérum humain. De même pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* et *S. aureus*, il a été montré qu'ils étaient capables de réquisitionner le fer de la ferritine, protéine de stockage du fer dans les cellules (Dale *et al.*, 2003 ; Bartrand, 2009).

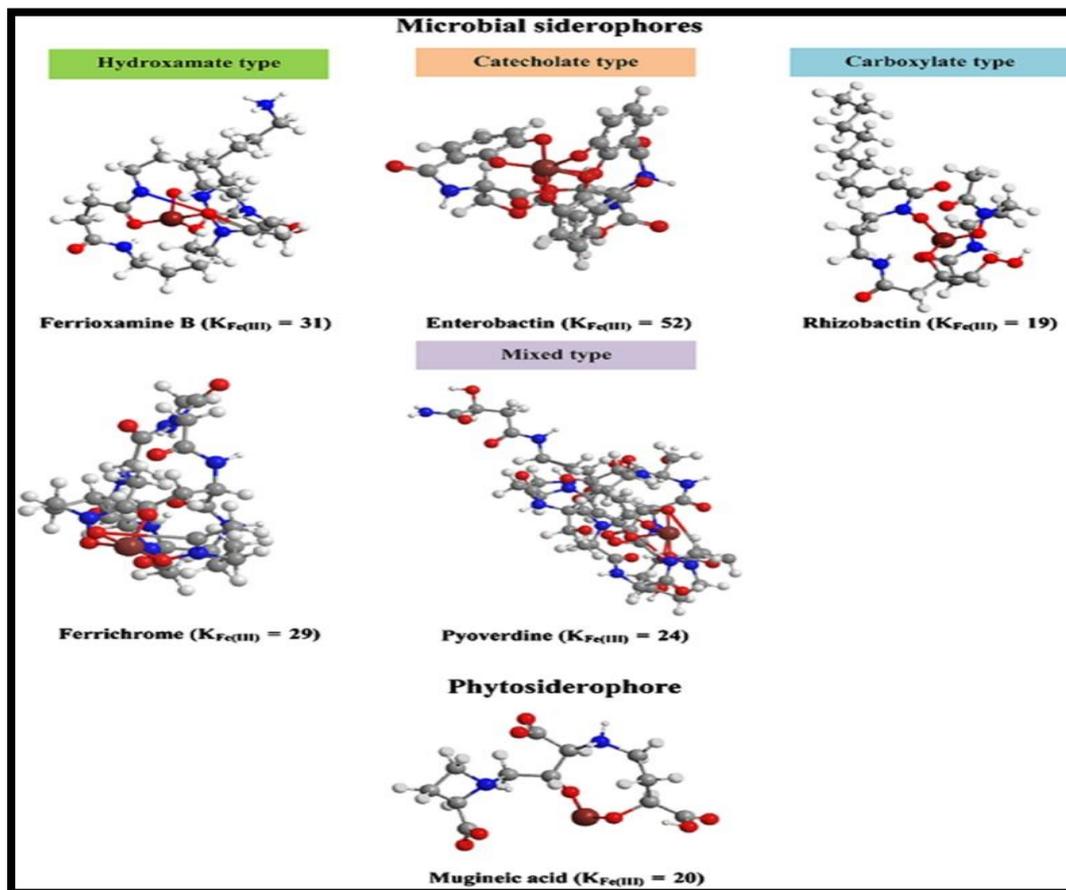


Figure 3 : Exemples représentatifs de sidérophores microbiens et de phytosidérophores (Ahmed and Holmström, 2014).

2.3.2. Ferritines de l'hôte

Les ferritines constituent une vaste superfamille de protéines de stockage du fer destinées à séquestrer le fer dans le cytoplasme des cellules eucaryotes comme procaryotes et en cas de carence fournissent le fer à la cellule. En cas de lyse de la cellule, elles se retrouvent dans l'environnement et pourraient ainsi constituer une source de fer pour les bactéries (Wandersman and Delepelaire, 2004).

2.3.3. *Staphylococcus* comme source de fer

Une étude a montré que *P. aeruginosa* était capable de lyser et d'utiliser *S. aureus* comme source de fer. L'analyse de l'expression de gènes, induits en conditions de carence en

fer chez *P. aeruginosa*, menée en co-culture avec *S. aureus* montre que *P. aeruginosa* perçoit cette co-culture comme une condition d'abondance en fer (Filkins *et al.*, 2015).

3. Régulation de l'homéostasie du fer

Le fer est indispensable à la survie de la plupart des bactéries, mais il est également toxique lorsqu'il existe en trop grande quantité. Ainsi les bactéries ont développé plusieurs mécanismes régulant l'acquisition et le métabolisme du fer, afin de garder une quantité assez élevée pour subvenir aux fonctions essentielles mais limitée pour éviter des dommages des composants cellulaires (Tronnet, 2017).

Quel que soit l'environnement colonisé par les bactéries ; sa concentration en fer est très faible. Face à cette carence en fer ; la plupart des bactéries ont développés cinq stratégies de base pour assurer l'homéostasie du fer (Meliani, 2012) :

- Transport avec une grande affinité du fer environnemental sous ces différentes formes.
- Stockage du fer dans la cellule (bactioferritine , ferritine...).
- Utilisation des systèmes de résistances au stress oxydant par dégradation des espèces oxygénés réactives et réparation des dommages induits par le stress oxydant.
- Contrôle de la consommation du fer par la régulation de l'expression des protéines impliquées dans son acquisition, son utilisation et son stockage.
- Coordination de la machinerie d'homéostasie du fer en fonction de la disponibilité du fer (Meksem, 2010).

3.1. Acquisition du fer chez les bactéries à Gram négatif

En conditions anaérobies, la source de fer pour les bactéries à Gram négatif est le fer ferreux (Fe^{2+}). Les bactéries pathogènes puisent leur source de fer de l'hème ou des protéines de stockage du fer chez l'organisme hôte. Pour la majorité des bactéries pathogènes, le fer est un cofacteur indispensable pour le fonctionnement de beaucoup d'enzymes. Une concentration de 10^{-7} à 10^{-5} M est nécessaire pour une croissance bactérienne optimale (Meliani, 2012).

En effet, le fer est oxydé en forme ferrique Fe^{3+} et polymérisé en hydroxydes de fer hautement insolubles (10^{-18} M). Ainsi, la concentration en fer libre dans un environnement aérobie varie de 10^{-9} à 10^{-18} M à pH7, alors que les bactéries nécessitent une concentration de 10^{-6} M pour une croissance optimale. Cette concentration est largement supérieure à la concentration de fer disponible chez l'hôte (10^{-24} M). Des mécanismes d'acquisition de fer très efficaces sont mis en place par les bactéries pathogènes afin d'acquérir ce nutriment essentiel

et d'établir une infection. Ces mécanismes étroitement liés à la virulence, reposent sur une liaison directe ou bien indirecte, bactéries et les sources de fer (Meliani, 2012) :

- **Acquisition indirecte** : basé sur des molécules synthétisés par les bactéries et sécrétées dans le milieu extracellulaire capables de complexer le fer (sidérophores) ou l'hème (hémophores) de diverses sources (Carton *et al.*, 2006).
- **Acquisition directe** : permet l'approvisionnement en fer directement des protéines qui en contiennent : c'est-à-dire par un contact direct entre les protéines de surface bactérienne et les sources de fer (transferrine, lactoferrine, ferritine) et d'hème (Hème, hémoprotéines) présentes chez l'hôte (Carton *et al.*, 2006).

3.2.Mécanismes de transport du fer chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif, la source de fer doit traverser les deux membranes (externe et cytoplasmique) qui constituent la paroi cellulaire en passant par le pèriplasme, afin d'être utilisée par la bactérie. Dans le cas du fer ferreux, le passage à travers la membrane externe peut se faire par l'intermédiaire des porines jusqu'au pèriplasme. Les porines localisées dans les membranes externes sont des canaux formant de larges pores de diffusion générale à travers lesquels les petits solutés peuvent diffuser en fonction de leur gradient électrochimique. La conductance de ce type de canal augmente linéairement avec la concentration en solutés. Ensuite, le fer est transporté dans le cytoplasme par les systèmes de transport FeoABC (*Ferrous iron transport ATP Binding Cassette*) constitués d'une petite protéine G ayant une activité GTP ase (Meliani, 2012).

3.3.Mécanisme de transport du fer chez les bactéries a Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, l'utilisation de différentes sources de fer comme la transferrine, l'hémoglobine ou la myoglobine a été démontrée plus récemment que chez les bactéries à Gram négatif. Contrairement à celle des bactéries à Gram négatif, l'enveloppe des bactéries à Gram positif est composée d'une seule membrane mais surtout d'une paroi épaisse. Cette paroi est une structure complexe difficile à traverser (Navarre and Schneewind, 1999).

Chez les bactéries à Gram positif, les sources de fer sont prises en charge suivant un schéma qui diffère de celui des bactéries à Gram négatif : des protéines affines liées à la paroi ou à la membrane (équivalentes aux protéines navettes des bactéries à Gram négatif) sont secondées par un transporteur ABC (*transporteur ATP Binding Cassette*) qui permet le passage au travers de la membrane plasmique. Il peut exister plusieurs récepteurs sélectifs qui utilisent un système ABC (*ATP Binding cassette*) (Krewulak and Vogel, 2008).

Les protéines affines sont exposées à la surface. Elles sont soit liées grâce une extrémité amino-terminale hydrophobe dans la membrane plasmique soit liées de façon covalente au peptidoglycane grâce à la présence d'un motif de type LPXTG (leucine, proline, n'importe acide aminé x, thréonine and glycine) dans leur région carboxyle-terminale. Cette liaison au peptidoglycane est obtenue par l'action d'enzymes spécialisées appelées sortases ou transpeptidases. Il existe 4 types de sortases (A, B, C et D) mais seule l'implication des deux premières est avérée dans le métabolisme du fer (**Ton-That *et al.*, 2004 ; Maresso and Schneewind, 2006**).

4. Influence du fer sur la formation des biofilms bactérien

Le fer est un nutriment essentiel dont il a été démontré qu'il régulait la formation de biofilms chez plusieurs espèces bactériennes. Chez certaines espèces, telles que *Legionella pneumophila*, *S. aureus* et *Streptococcus mutans*, le fer empêche la formation de biofilm (la limitation en fer induit la formation de biofilm). En revanche, la limitation en fer inhibe la formation de biofilms chez d'autres espèces telles que *Vibrio cholerae* et *E. coli*, *Xylella fastidiosa*. Cependant, la régulation de la formation de biofilms par le fer peut être assez complexe même au sein d'une même espèce (**Wu and Outten, 2008**).

Plusieurs études ont montré que le fer réagit positivement avec la formation de biofilm chez *Staphylococcus* spp. Ces résultats ont également montré que la formation de biofilm de *S. aureus* est multifactorielle et que de nombreux facteurs peuvent avoir une influence sur la formation de biofilm (**Lin *et al.*, 2012**).

La relation compliquée entre la disponibilité en fer et la formation de biofilms a été étudiée de manière approfondie chez l'agent pathogène opportuniste, *P. aeruginosa*. Chez cette espèce, la limitation en fer peut réduire la formation de biofilms en bloquant les premières étapes de la formation de micro-colonies. L'activité de chélation du fer de la lactoferrine humaine peut également diminuer la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*, et il a été suggéré que cela pourrait jouer un rôle dans la limitation de l'infection. Récemment, il a été démontré que l'éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA), un chélateur de cations divalents à large spécificité, entraîne la dispersion du biofilm de *P. aeruginosa* ainsi que la mort cellulaire (**Figure 4**). L'ajout de fer, de calcium ou de magnésium protège contre la destruction méditée par l'EDTA suggère que ces métaux sont essentiels au maintien du biofilm. Cependant, il a également été démontré que des concentrations élevées en sels de fer perturbent la formation de biofilms chez *P. aeruginosa* (**Musk *et al.*, 2005 ; Wu and Outten, 2008**).

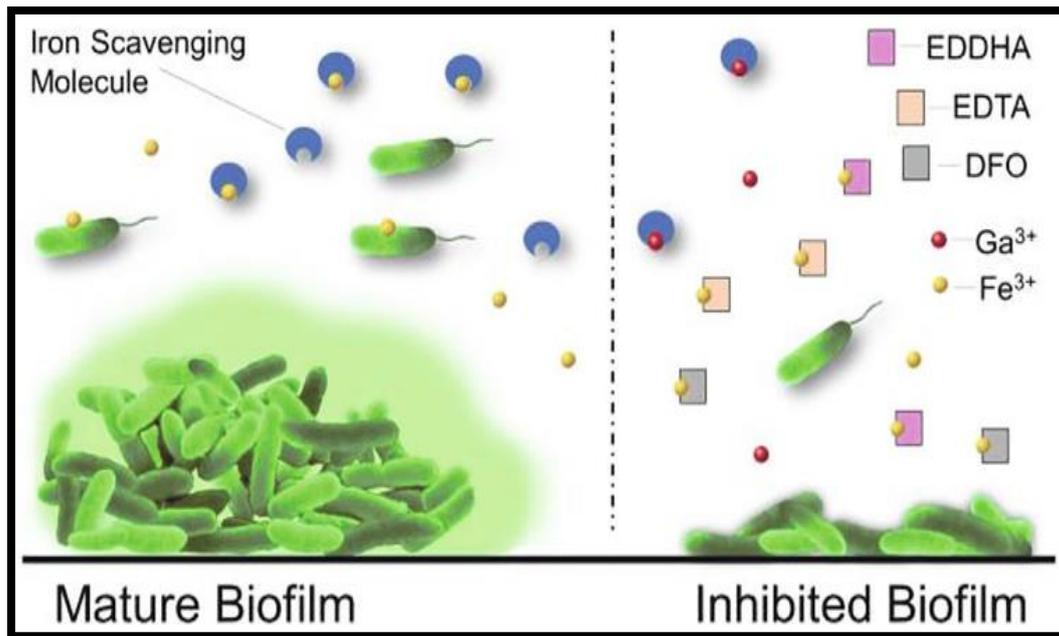


Figure 4 : L'interférence avec l'acquisition de fer inhibe la formation de biofilm bactérien
(Kang and Kirienko, 2018).

Partie II : Partie pratique

Chapitre 1. Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1.

1. Souches bactériennes

Cette étude a porté sur deux souches cliniques appartenant aux espèces *Pseudomonas aeruginosa* (bacille à Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (coque à Gram positif). L'isolement, l'identification et la caractérisation de ces souches ont été réalisés selon les méthodes conventionnelles.

Les profils de résistance aux ATB des souches étudiées ont été aussi déterminés selon la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM, 2014) (Annexes 1). Ainsi, les ATB testés sur *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont respectivement rapportés dans les **tableaux 1** et **2**.

Tableau 1. Antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.

N°	ATB	Abréviation	Charge (µg)	Famille
01	Ticarcilline	TIC	75	β-Lactamines
02	Pipéracilline	PIR	100	
03	Pipéracilline + Tazobactam	TZP	110	
04	Ceftazidime	CAZ	30	
05	Cefepime	FEP	30	
06	Aztréonam	ATM	30	
07	Imipénème	IPM	10	
08	Fosfomycine	FOS	200	Acides phosphoniques
09	Gentamicine	CN	15	Aminosides
10	Amikacine	AKN	30	
11	Ciprofloxacine	CIP	5	Quinolones
12	Sulfaméthoxazole + Triméthoprime	SXT	25	Sulfamides
13	Colistine	CT	50	Polymyxines
14	Chloramphénicol	CHL	30	Phénicolés

Tableau 2. Antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus*.

N°	ATB	Abréviation	Charge (µg)	Famille
01	Pénicilline	P	10	β-Lactamines
02	Ceftazidime	CAZ	30	
03	Amoxicilline	AX	25	
04	Gentamicine	CN	10	Aminosides
05	Amikacine	AK	10	
06	Ciprofloxacine	CIP	5	Quinolones

2. Etude de l'effet du fer sur la formation de biofilm

Cette étude vise à expérimenter les effets d'une molécule de nature minérale à savoir le fer sur l'adhésion de *P. aeruginosa* (PA) (Annexe 2.1) et *S. aureus* (SA) (Annexe 2.2). Il s'agit du sel FeCl₃ (O'May *et al.* 2009).

L'estimation de la biomasse attachée aux tubes en polystyrène est réalisée à l'aide de la méthode semi-quantitative de coloration au cristal violet (CV). Il s'agit d'une mesure colorimétrique de l'incorporation du CV par les cellules sessiles et les substances exopolymériques (Alnassouri, 2010 ; Lattab, 2018).

Dans le cas d'une augmentation possible de l'adhésion bactérienne, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'augmentation de biofilms. Il est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'augmentation (\%)} = \frac{|\text{DO Test} - \text{DO Témoin}|}{\text{DO Témoin}} \times 100.$$

Dans le cas d'une éventuelle inhibition de la formation de biofilms, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de réduction de biofilms. Il est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage de réduction (\%)} = \frac{|\text{DO Test} - \text{DO Témoin}|}{\text{DO Témoin}} \times 100.$$

Une gamme de concentrations croissantes du sel a donc été testée pour l'étude de l'effet du FeCl₃ sur la formation du biofilms de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Le FeCl₃ a été ajouté au bouillon LB aux concentrations de : 0.27, 0.55, 5.55, Et 11.11 µm.

2.1. Préparation des suspensions bactériennes initiales

Pour la réalisation des expérimentations, les bactéries à étudier sont ensemencées sur gélose Luria-Bertani (LB) (**Annexe 3.1**) . Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

Quelques colonies sont alors suspendues dans le milieu LB liquide (**Annexe 3.2**), exempté de FeCl₃ (LB Témoin) ou additionné de différentes concentrations de FeCl₃ (LB Test) et la densité optique $\lambda = 600$ nm (DO) de la suspension résultante est ajustée à la valeur de 0.2 à l'aide d'un spectrophotomètre «Modèle Shimadzu».

2.2. Test de formation de biofilms en tubes

Les suspensions bactériennes ainsi préparées sont réparties dans des tubes en polystyrène de 5 ml à raison de 2 ml de suspension par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

2.3. Lecture

Après incubation, les tubes sont retirés et l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm pour chacun des tubes. Ces derniers sont alors débarrassés de la culture bactérienne après rinçages successifs à l'eau distillée (ED). La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de CV à 1 % (**Annexe 3.3**). Après un temps de contact de 1 heure du temps, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'ED.

Le CV fixé sur les parois du tube est solubilisé à l'aide d'une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25) (**Annexe 3.4**) pendant 1 heure. Puis l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La masse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité de biofilm formé (**Musk et al., 2005**).

3. Traitement statistique des résultats

Les résultats de ces expérimentations ont été présentés sous forme de moyenne \pm écart type (MOY \pm ET).

Les moyennes sont comparées aux témoins à l'aide du test t de Student. Les différences ont été considérées comme :

- Significatives (*) : comparant aux témoins pour une valeur de probabilité $p < 0.05$.
- Hautement significatives (**): comparant aux témoins pour une valeur de probabilité $p < 0.01$.
- Très hautement significatives (***) : comparant aux témoins pour une valeur de probabilité $p < 0.001$.

Chapitre2 : Résultats et discussion

1. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La détermination des profils de sensibilité aux ATB, a été réalisée en pratiquant l'antibiogramme standard et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du SFM.

Selon le profil de résistance déterminé, la souche PA apparaît résistante à 06 ATB, appartenant aux β -Lactamines (TIC, PIR, TZP et IMP), les sulfamides (SXT) et les phénicolés (CHL) (**Tableau 3 et Annexes 4**). Les ATB faisant parties des familles suivantes : les β -Lactamines (ATM), les acides phosphoniques (FOS), les aminosides (CN, AKN), les quinolones (CIP) et les polymyxines (CT) sont les molécules les plus actives sur cette souche. Cette dernière exhibe également une sensibilité intermédiaire vis-à-vis la CAZ et le FEP.

Tableau 3. Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*
(S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante).

ATB	TIC	PIR	TZP	CAZ	FEP	ATM	IPM
PA	R	R	R	I	I	S	R
ATB	FOS	CN	AKN	CIP	SXT	CT	CHL
PA	S	S	S	S	R	S	R

Contrairement à la souche PA, la souche SA apparaît sensible à l'ensemble des ATB testés à l'exception de la CAZ appartenant aux β -Lactamines (**Tableau 4 et Annexes 5**).

Tableau 4. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*
(S : Sensible, R : Résistante).

ATB	P	CAZ	AX	CN	AK	CIP
SA	S	R	S	S	S	S

2. Effet du fer sur la formation de biofilms

Étant donné que l'hôte et les agents pathogènes ont besoin du fer pour leurs processus cellulaires, l'homéostasie du fer est devenue un sujet important dans le contexte de la pathogénèse microbienne. Pour cette raison, plusieurs travaux suggèrent que cet élément joue un rôle majeur dans la régulation et la formation de biofilms (**Kang and Kirienko, 2018**).

L'objectif de ce travail expérimental, vise à étudier l'influence du fer sur l'adhésion et la formation de biofilms de deux souches cliniques à savoir *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ainsi, le bouillon LB a été préalablement préparé et additionné du fer (molécule minérale) sous forme de chlorure de fer (III) (FeCl_3) à des concentrations croissantes puis inoculé par les souches étudiées selon le protocole déjà détaillé. Le sel a été ajouté aseptiquement au milieu LB aux concentrations : 0.27, 0.55, 5.55 et 11.11 μM .

L'évaluation de la biomasse adhérente en présence du fer, a été réalisée après 24 heures d'incubation des cultures réalisées dans des tubes en polystyrène suivant la technique standard de coloration au CV.

Le choix du polystyrène (matériau hydrophobe) en tant qu'un support pour l'adhésion et la formation de biofilm est justifié par le fait que plusieurs travaux parmi lesquels celui de **Huang et al. (2009)** ont montré que les cellules bactériennes préfèrent pour l'adhésion les surfaces hydrophobes plutôt que celles hydrophiles.

2.1. Effet du fer sur la formation de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un agent pathogène humain opportuniste qui provoque des infections débilitantes, en particulier chez les patients atteints de la mucoviscidose, où il peut causer des infections chroniques caractérisées par la formation de biofilms (**Patriquin et al., 2008**).

2.1.1. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de *Pseudomonas aeruginosa*

Les cellules bactériennes qui croissent dans un biofilm sont physiologiquement distinctes des cellules planctoniques d'un même organisme, qui, par contraste, sont des cellules qui peuvent flotter dans un milieu liquide.

Afin d'évaluer la proportion de cellules planctoniques, non fixées, les valeurs de densités optiques sont mesurées à 600 nm. Cette mesure doit se faire avant l'élimination de la culture bactérienne, une étape essentielle avant d'entamer la coloration au CV.

Les résultats de croissances bactériennes ($\lambda=600$ nm), obtenus après 24 heures d'incubation en LB, sont illustrés dans la **figure 5**.

L'analyse statistique des valeurs obtenues révèle une diminution hautement significative ($P<0.01$) de la croissance planctonique en présence d'une concentration de $0.27\mu\text{M}$ de FeCl_3 comparativement au témoin. En effet, l'addition de fer à cette dose se traduit par une réduction significative de la croissance de *P. aeruginosa*. Celle-ci a été de l'ordre de 91.69 %.

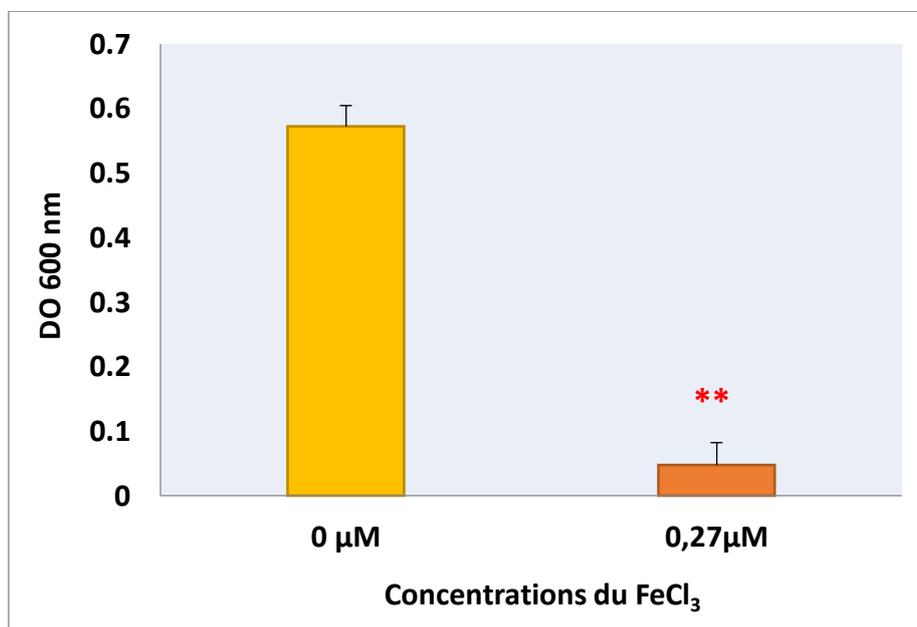


Figure 5. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de *P. aeruginosa*
(Différence hautement significative : ** $P<0.01$)

L'étude de **Patriquin et al. (2008)** a révélé aussi une inhibition de la croissance des cellules planctoniques en présence de niveaux faibles de fer et inférieurs à une concentration de 1M.

2.1.2. Effet du fer sur l'adhésion des cellules sessiles de *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats obtenus, après 24 heures d'incubation en présences des différentes concentrations en FeCl_3 sont présentés dans le **tableau 5** et illustrés par la **figure 6**. Ils ont permis de mettre en évidence la capacité de la souche PA à former des biofilms sur la surface hydrophobe (polystyrène) après culture en bouillon LB.

Une augmentation de la capacité d'adhésion des cellules bactériennes est également constatée en présence des faibles concentrations en FeCl_3 additionnées dans le milieu LB. Il s'agit de 07.48% pour la dose de 0.27 μM et 38.88% pour la dose de 0.55 μM .

Tableau 5. Effet du FeCl_3 sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa*

Concentrations en FeCl_3	% d'augmentation de biofilm	% de réduction de biofilm
0.27 μM	07.48%	//
0.55 μM	38.88%	//
5.55 μM	/	39.32%
11.11 μM	/	62.96%

(/ : Absence d'augmentation, // : Absence d'inhibition).

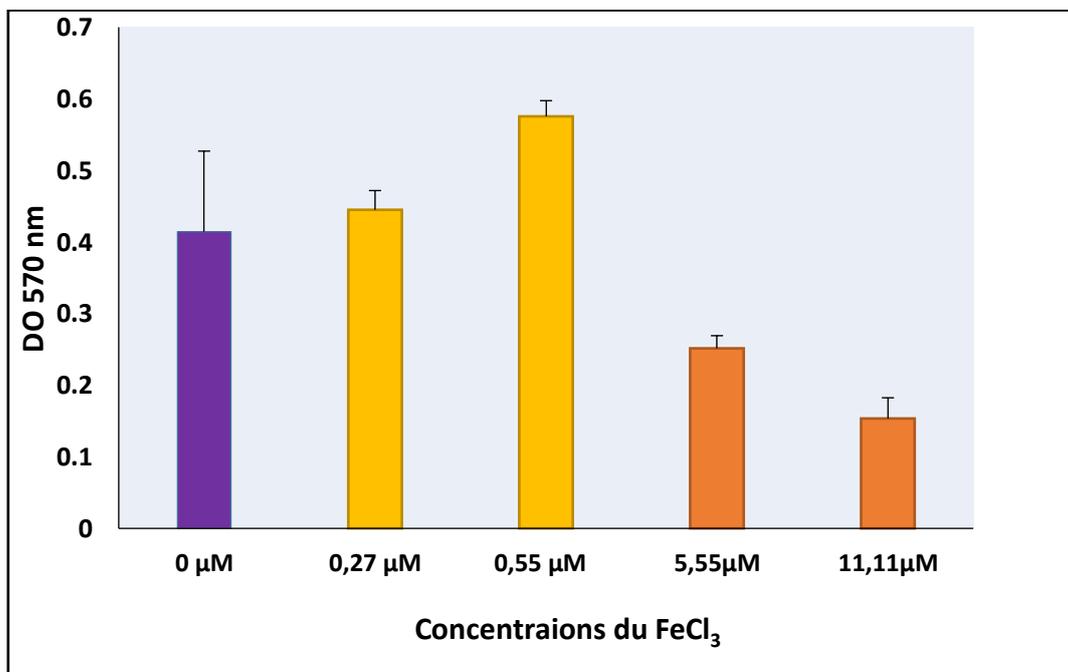


Figure 6 . Effet des différentes concentrations en fer (FeCl_3) sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa*.

Par ailleurs, il a été également constaté que l'addition de fortes doses en sel dans le milieu (à partir de $5.55\mu\text{M}$ et plus) se traduit par une réduction significative de la biomasse de *P. aeruginosa* (**Figure 6**). Celle-ci a été de l'ordre de 39.32% pour une dose de $5.55\mu\text{M}$ et de 62.96% pour une dose maximale de $11.11\mu\text{M}$ de FeCl_3 (**Annexe 6**).

L'analyse statistique des résultats obtenus montre l'absence d'une différence significative ($P>0.05$) au niveau de la formation de biofilm après addition du fer, à différentes concentrations, en comparaison avec le témoin.

Ces résultats semblent être en accord avec ceux obtenus par **Musk et al. (2005)** suite à des expériences *in vitro* de croissance. D'un côté, ils ont montré une croissance importante de *P. aeruginosa* après culture dans des conditions limitées en fer en comparaison avec celles riches en fer (**Musk et al., 2005**). D'un autre côté, ils ont indiqué que des souches de *P. aeruginosa*, préalablement isolées à partir des expectorations de 20 patients atteints de la mucoviscidose, ont présenté une réponse similaire à des fortes concentrations en fer. Des analyses antérieures du profil d'expression génétique ont montré que des niveaux élevés de fer répriment l'expression de gènes dont les produits sont essentiels à la récupération du fer et que l'expression de ces gènes est essentielle à la virulence. Ces résultats, combinés aux données de profilage transcriptionnel existantes, indiquent actuellement que des concentrations de fer élevées répriment l'expression de certains gènes essentiels à la production de biofilms chez *P. aeruginosa*.

Ces résultats sont en accord encore avec ceux obtenus par **Lin et al. (2016)** dans des études antérieures qui montrent que *P. aeruginosa* avait besoin de fer pour la formation de biofilm. Dans ce cas, le fer régule la motilité de surface et favorise la formation de biofilm de *P. aeruginosa* en stabilisant la matrice polysaccharidique. Cependant, le fer à forte concentration supprime la libération d'ADN par les cellules mortes de *P. aeruginosa*, composant structurel important des biofilms, et inhibe la formation de biofilm.

De même, les auteurs **Liang Yang et al. (2007)** ont constaté une inhibition de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1 dans des microplaques après ajout de fer à des concentrations croissantes.

Selon les résultats obtenus, la dose $0.27\mu\text{M}$ de ce sel semble exhiber un effet inhibiteur sur la multiplication des cellules planctoniques de PA. Ce phénomène d'inhibition en présence de cette même concentration n'a pas lieu lors de développement du biofilm.

Il est bien connu que les cellules adhérentes aux surfaces solides ont des propriétés différentes de ceux des cellules planctoniques. En effet, les bactéries adhérentes sont exposées

à des conditions environnementales différentes de celles trouvées dans la phase aqueuse (Teixeira and Oliveira, 2002).

2.2. Effet du fer sur la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est l'un des principaux agents pathogènes associés aux infections nosocomiales et à la bactériémie. Les patients particulièrement à risque de contracter des infections à *S. aureus* sont ceux qui possèdent des dispositifs médicaux à demeure. Cette bactérie peut les coloniser sous forme d'un biofilm (Johnson *et al.*, 2008).

2.2.1. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de *Staphylococcus aureus*

L'action du fer sur la croissance cellulaire de *S. aureus* a également été suivie dans le milieu de culture LB. Les résultats obtenus sont illustrés par la **figure 7**.

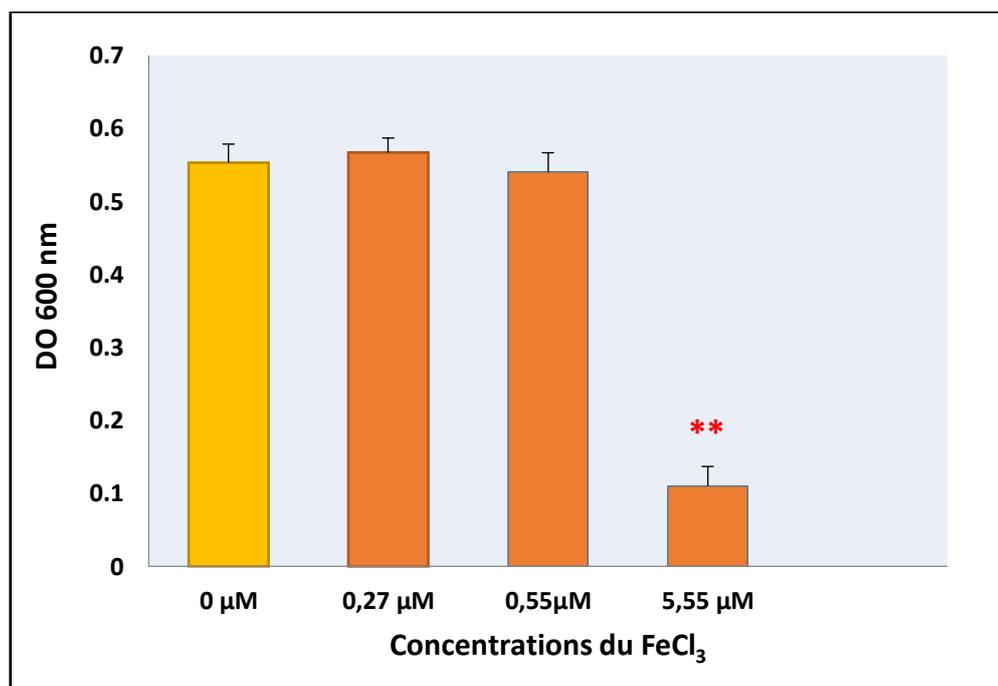


Figure 7. Effet du fer sur la croissance des cellules planctoniques de *S. aureus*

(Différence hautement significative : ** P<0.01)

L'histogramme révèle une augmentation de la densité cellulaire (phase planctonique) après addition de fer au milieu LB à une dose de 0.27 μM. Cette augmentation statistiquement non significative (P>0.05) a été seulement de l'ordre de 2.53%.

Par contre, une chute de la croissance cellulaire a été observée pour les deux concentrations 0.55 et 5.55 μ M. Cette diminution est plus importante lorsque le fer a été ajouté à la concentration de 5.55 μ M. Elle est statistiquement hautement significative ($P < 0.01$). En effet, les pourcentages de réduction calculés pour ces deux doses sont respectivement : 2.26% et 80.10%.

2.2.2. Effet du fer sur l'adhésion des cellules sessiles de *Staphylococcus aureus*

Les résultats mentionnés dans le **tableau 6** révèlent les pourcentages d'augmentation et de réduction de la formation du biofilm de SA sur polystyrène.

Tout d'abord, les résultats obtenus avec SA ont permis aussi de noter que la souche SA possède la capacité à se fixer aux parois des tubes en polystyrène et à former des biofilms. Ces résultats sont visiblement similaires à ceux obtenus avec PA mais certaines modifications ont été notées. En effet, aucune différence au niveau de l'adhésion cellulaire au polystyrène n'a été observée après addition de 0.27 μ M de sel (**Annexe7**).

En outre, une augmentation statistiquement significative ($P < 0.05$) de la capacité d'adhésion des cellules bactériennes (42.10%), après ajout de fer, est constatée pour la deuxième concentration de fer testée à savoir 0.55 μ M (**Figure 8**).

Tableau 6. Effet du FeCl₃ sur la formation du biofilm de *S. aureus*

Concentrations en FeCl ₃	% d'augmentation de biofilm	% de réduction de biofilm
0.27 μ M	0%	/
0.55 μ M	42.10%	/
5.55 μ M	/	17.10%
11.11 μ M	/	19.07%

(/ : Absence d'augmentation, / : Absence d'inhibition).

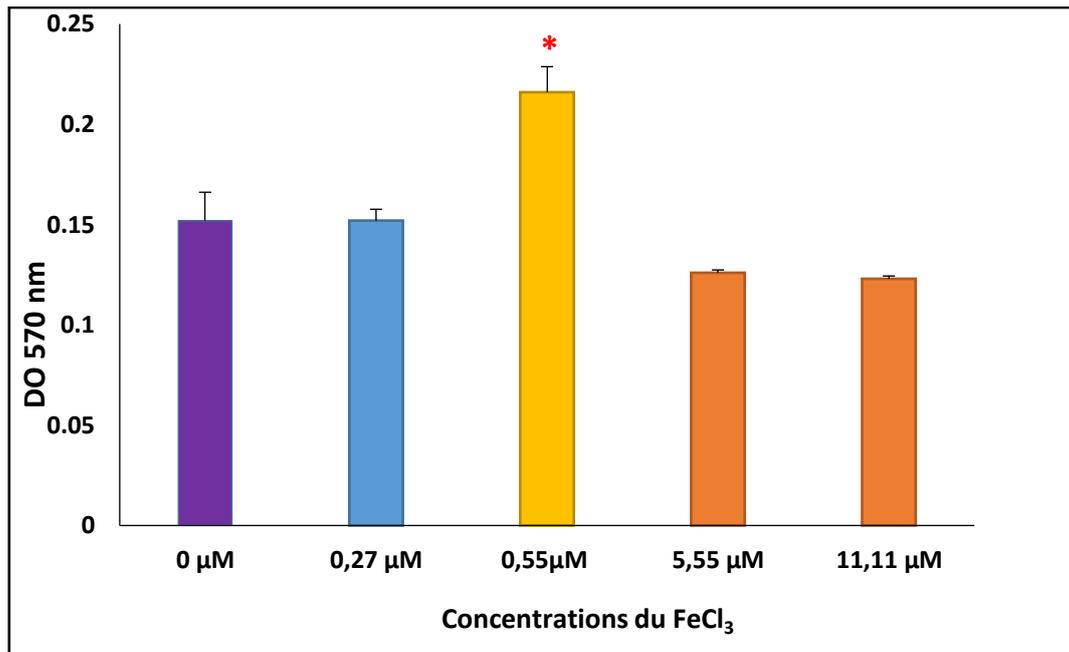


Figure 8. Effet des différentes concentrations en fer (FeCl₃) sur la formation du biofilm de *S. aureus* (Différence significative : * P<0.05).

L'addition de fer à des fortes concentrations (5.55 et 11.11 μM) semble avoir un effet inhibiteur marqué sur l'adhésion cellulaire en milieu LB. Cependant, il semble plus accentué pour la concentration 11.11 μM avec laquelle un taux d'inhibition de 19.07% a été obtenu. En effet, aucune différence significative (P>0.05) n'a été notée pour ces deux concentrations.

Ces résultats semblent être en accord avec ceux obtenues par **Johnson *et al.*, (2008)**. Ces auteurs ont montré que la production de biofilms chez *S. aureus* peut-être soit induite par les conditions limitées en fer soit elle peut être atténuée par le fer via un mécanisme Fur-indépendant. Ce dernier semble jouer un effet régulateur positif et négatif dans les cas de faible teneur en fer.

Par ailleurs, selon **Lin *et al.* (2016)**, différents résultats ont été rapportés après étude de l'implication du fer dans la formation de biofilm chez les Staphylocoques. En plus, plusieurs études antérieures ont montré que le fer peut exercer un effet positif sur l'adhésion de ces bactéries. L'étude qui a été faite par ces mêmes autres, a montré que le fer a empêché l'adhésion de la souche *S. aureus* de Newman. Cette dernière lorsqu'elle a été cultivée dans un milieu pauvre en fer a pu former des biofilms et elle a exprimé deux déterminants de la virulence, Eap et Emp, nécessaires à la formation de biofilm dans des conditions de carence en fer.

En définitive, ces travaux ont indiqué que la formation de biofilm chez *S. aureus* est multifactorielle et que de nombreux facteurs peuvent ainsi avoir une influence sur la formation de biofilm.

Suite à l'étude de l'influence de fer sur la formation de biofilms de *S. aureus*, les résultats obtenus révèlent deux phénomènes chez cette bactérie en fonction de la concentration de FeCl_3 ; le premier stimule et le deuxième inhibe l'adhésion. Un comportement comparable a été également observé dans l'état planctonique, néanmoins l'effet inhibiteur de la dose $0.55\mu\text{M}$ sur la densité cellulaire (phase planctonique) s'accompagne visiblement d'une augmentation de l'adhésion de SA. Ce phénomène démontre, à l'instar de celui observé chez PA, que le fer affecte la croissance cellulaire ainsi que la fixation de bactéries mais d'une manière visiblement différente.

Ainsi, il semble, une fois encore qu'en fonction de la disponibilité de fer les cellules sessiles exhibent un comportement différent comparé à celui des cellules planctoniques.

Conclusion

Conclusion

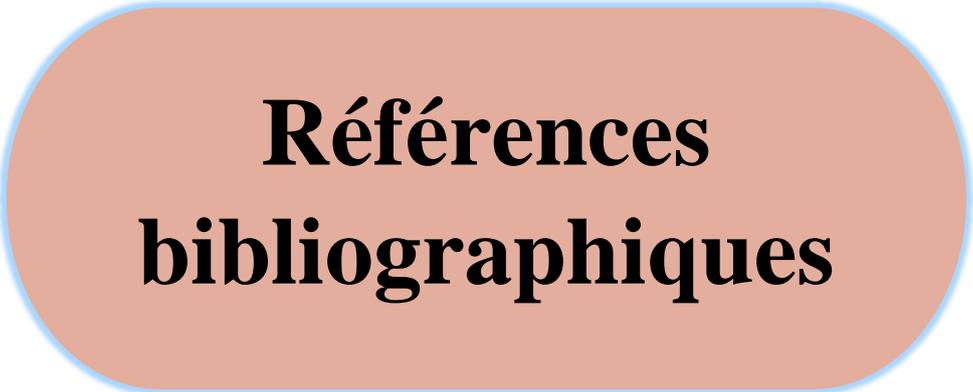
Les biofilms bactériens sont responsables de nombreuses infections nosocomiales extrêmement difficile à l'éradiquer.

Cette étude menée sur l'effet de fer sur l'adhésion et la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (bacille à Gram négatif) et *S. aureus* (Cocci à Gram positif), provenant de prélèvements cliniques, a permis de déceler et de confirmer, une fois de plus, que le fer contribue à la régulation de la production de biofilms bactériens.

Par ailleurs, les résultats obtenus révèlent deux phénomènes à peu près inverses en fonction de la concentration de fer (FeCl_3) testée ; le premier stimulateur d'adhésion ($0.27\mu\text{m}$, $0.55\mu\text{m}$) et le deuxième inhibiteur ($5.55\mu\text{m}$, $11.11\mu\text{m}$). En effet, la méthode de coloration au CV a permis de mettre en évidence l'aptitude des deux souches bactériennes à adhérer et à produire des biofilms sur tubes en polystyrène en présence de différentes concentrations en fer. Toutefois, cette formation est stimulée par des faibles concentrations en fer et inhibée par des fortes concentrations en fer.

Ainsi, il semble, qu'en fonction de la disponibilité en fer, les cellules sessiles exhibent un comportement différent comparé à celui des cellules planctoniques.

La lutte contre les biofilms, constituées de bactéries pathogènes, repose sur de nouvelles méthodes d'élimination parmi lesquelles l'inhibition du processus d'adhésion. Or la grande majorité de ces méthodes est toujours au stade expérimental. A ce jour, il n'existe aucun moyen efficace d'élimination de biofilms. Ces résultats prometteurs ont une grande importance et ouvrent d'autres pistes de recherche scientifique pour l'inhibition de l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms sur surface biotiques et abiotiques.



**Références
bibliographiques**

A

- Ahmed E., Holmström SJM. (2014).** Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* ; 7(3) : 196–208.
- Ahmed E., Holmström SJM.(2014).** exemples représentatifs de sidérophores microbiens et de phytosidérophores. dessin à l'aide du logiciel ChemDraw Standard. *Microbial Biotechnology* ;7(3).
- Alnassouri M.(2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau .Thèse de doctorat : génie des procédés et des produits. Lorraine :institut national polytechnique de lorraine école doctorale : ressources procédés produits environnement(RP2E) ;197p .Disponible sur : http://docnum.univ-lorraine.fr/public/INPL_2010_ALNNASOURI_M.pdf consulté le (29/02/2019).
- Ana Cecilia de Andrade Pinho Medeiros .** Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées.2016.188 p. thèse de doctorat, mécanique des fluides, Energétique, Procèdes, Université Grenoble Alpes, 2017.
- Andersen, C. B. F., Stødkilde, K., Sæderup, K. L., Kuhlee, A., Raunser, S., Graversen, J. H., Moestrup, S. K. (2017).** Haptoglobine. *Antioxidants & Redox Signaling* ; 26(14) : 814–831.
- Aparna M., Yadav S. (2008).** Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* ;12(6) :526-30.
- Arques, S. (2018).** Albumine sérique et maladies cardiovasculaires : une revue approfondie de la littérature. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* ; 67(2) : 82–90.

B

- Bailey JE., Ollis D. (1986).** Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Baker, E. N. (1994).** Structure and reactivity of transferrins. *Adv. Inorg. Chem.* 41, 389–463.
- Banerjee, P., Singh ,M.,Sharma, V.(2015).** BIOFILM Formation: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences* ;3(2) :556-560.
- Bartrand,S.** Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum* : identification, synthèse et applications.230 p. Thèse de doctorat, Chimie des Biomolécules - Synthèse, Structure et Réactivité, Université d'angers, 2009.

- Baudin, B. (2016).** Les hémoglobines normales et pathologiques. *Revue Francophone Des Laboratoires* ; 2016(481) : 27–34.
- Bendinger, B., Rijnaarts, HHM., Altendorrf, K., Zehnder, ajb.(1993).** 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.
- Blenkinsopp SA ., Costerton, JW.(1991) .** Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnology*; 9(1): 138-143.
- Block, JC., Haudidier, K., Paquin, JL., Miazga, J ., Levi ,Y. (1993).** Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling* ; 6: 333-343.
- Branger, A.** Microbiochimie et alimentation .France : Educagri Editions, 2007 .343 p.
- Brauge, T.** Étude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de *Listeria monocytogenes*. 415p .Thèse de doctorat, école doctorale des Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement, Université Lille 1, 2015.
- Briandet , R ., Fechner, L ., Naïtali ,M ., Dreanno, C.** Biofilms, quand les microbes s'organisent. France : Editions Quae ,2012.175 p.

C

- Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J., Andrews, S. C. (2006).** Feo – Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *BioMetals* ; 19(2) : 143–157.
- Characklis W.G, Marshall K.C. 1990.** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Chung, I J., Park, YS. (1983).** Ethanol fermentation by *S. cerevisiae* in a bioreactor packed Vertically with ceramic rods. In Proc.-Pac. Chem. Eng. Congr., 3rd, *Korean Institute of Chemical Engineering*, Seoul, Korea; 4: 174–179.
- Clutterbuck ,AL., Woods , E., Knottenbelt , D., Clegg , PD., Cochrane , CA., Percival , SL.(2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*; 121(1-2): 1-17.
- Coester, S., Cloete ,T .(2005) .** Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 213-232 p.
- Cohen, Y. (2002).** Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int. Microbiol*; 5: 189-193.
- Costerton ,W.** A Short History of the Development of the Biofilm Concept . Washington :ASM Press :2004. 4-19 p

D

Dale, S. E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., Heinrichs, D.E. (2003). Role of Siderophore Biosynthesis in Virulence of *Staphylococcus aureus*: Identification and Characterization of Genes Involved in Production of a Siderophore. *Infection and Immunity* ; 72(1) : 29–37.

Demirci, A, Pometto III AL and K-LG Ho. (1997). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm Reactors. *Industrial Microbiology & Biotechnology* ;19: 299–304.

Donlan, RM., Costerton, JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* ; 15: 167–193.

Dufour, D., Leung, V., Lévesque, C.(2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic topics* ;22(1) :1-136.

Duhutrel P. Métabolisme du fer et de l'hème chez *Lactobacillus sakei*. 197 p. Thèse de doctorat : microbiologie. Paris : institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech) ; 2011.

F

Filkins, L M., Graber, J A., Olson, D G., Dolben, E L., Lynd, L R., Bhujju, S., O'Toole, G. A. (2015). Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. *Journal of Bacteriology* ;197(14) : 2252–2264.

Filloux A., Vallet I. (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine / Sciences* ; 19 : 77– 83.

Filloux A., Vallet I. (2003). Image en microscopie confocale d'un Biofilm bactérien mixte . observation microscopique. *EDP Sciences* ; 19(1) :77-83.

Flemming, H., Wingender, J.(2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) part 2 : technical aspects. *Water sci technol*;43:9-16.

Fletcher, M.(1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *Journal of bacteriology* ; 170(5) :2027-2030.

Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P. (2004). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13: 34-40.

G

Garret, TR., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces.
Progress in Natural Science :18(9) :1049-1056.

Goller, CC., Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322: 37- 66.

H

Halbrooks, PJ., Mason, AB., Adams, TE., Briggs, SK., Everse, SJ. (2004). The oxalate effect on release of iron from human serum transferrin explained. *J Mol Biol* ;339 (1): 217-226.

Hamilton, WA. (1985). Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion.
Ann. Rev. Microbiol ; 39:195.

Hannauer, M. Études des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition du fer par la pyoverdine et le ferrichrome chez *Pseudomonas aeruginosa*. 255P. thèse de doctorat, Science du vivant : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la biologie, Université de Strasbourg, 2011.

Hayrapetyan, H., Siezen, R., Abee, T., Nierop Groot, M. (2016). Comparative Genomics of Iron-Transporting Systems in *Bacillus cereus* Strains and Impact of Iron Sources on Growth and Biofilm Formation. *Front Microbiol*; 7(842).

Huang, CY., Hsieh, SP., Pei-An, Kuo., Wann-Neng, Jane., Jenn, Tu., Ya-Nan, Wang., Chun-Han, Ko. (2009). Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for a *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(8), 998-1007.

I

Irie, Y., Parsek, MR. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol immunol*; 322 :67-84.

J

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, MA., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, MA. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* ;81(1) :7-11.

Johnson, M., Cockayne, A., Morrissey, J. A. (2008). Iron-Regulated Biofilm Formation in

Staphylococcus aureus Newman Requires ica and the Secreted Protein Emp. *Infection and Immunity*, 76(4), 1756–1765.

K

Kang, D., Kirienko, N V. (2018). Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology* ; 56(7) : 449–457.

Kang, D., Kirienko, N V. (2018). Interfering with bacterial iron acquisition inhibits biofilm formation. 2018 schéma. *Journal of Microbiology*; 56(7).

Kaplan, J B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research* ; 89(3) : 205–218.

Krewulak, K D., Vogel, H J. (2008) .Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* ; 1778(9): 1781-1804.

L

Lattab, A .Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. 215 p. Thèse de doctorat, microbiologie, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 2018.

Lebeaux D., Ghigo J M.(2012). Infections associées aux biofilms. *EDP Sciences* ; 28 (8-9) :727-739 p.

Lee, K., Yoon, S S.(2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*, 27(6) :1053-1064.

Lewis, K. (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 45(4), 999–1007.

Lin, C S., Tsai, Y H., Chang, C J., Tseng, S F., Wu, T R., Lu, C C., Wu, T S., Lu, J J., Horng, J T., Marte, J I., Ojcius, D M., Lai, H C., Young, J D.(2016). An iron detection system determines bacterial swarming initiation and biofilm formation. *Scientific Reports* ; 6 (36747) :1-13.

Lin, M H., Shu, J C., Huang, H Y., Cheng, Y C.(2012). Involvement of iron in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*;7(3).

Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7).

Lorite, G S., Rodrigues, C M., de Souza, A A., Kranz, C., Mizaikoff, B., Cotta, M A. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on

Xylella fastidiosa adhesion and biofilm evolution. *Journal of Colloid and Interface Science* ; 359(1) : 289–295.

M

- Maresso, A W., Chapa T J., Schneewind ,O. (2006).** Surface protein IsdC and sortase B are required for heme-iron scavenging of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol*; 188(23): 8145-8152.
- Martinez ,LR., Casadevall , A.(2007).***Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and Carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environnemental Microbiology*;73(14): 4592-.4601.
- Meksem, A.**études structurales et fonctionnelles des récepteurs Ton B-dépendants de bactéries a Gram négatif.211p.thèse de doctorat : aspects cellulaire et moléculaire de la biologie.Strasbourg : école doctorale des sciences de la vie et de la santé ; 2010.
- Meliani, A.** Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens*.272 p. Thèse de doctorat : Ecologie microbienne. Oran : Université d'Oran ; 2012.
- Mittelman ,MW. (1996).** Adhesion to biomaterials. *Bacterial Adhesion . molecular and ecological diversity.new York : wiley-liss ; 89- 127.*
- Monroe. D.(2007).**Les étapes de la formation d'un biofilm et leur aspect microscopique . schéma. *PLoS Biology* ; 5(11).
- Musk, DJ., Banko ,D A., Hergenrother , P J. (2005).** Iron Salts Perturb Biofilm Formation and Disrupt Existing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology* ;12(7) : 789–796.

N

- Navarre, W W., Schneewind, O. (1999)** .Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* ; 63 (1) : 174-229.
- Neilands, JB.(1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The journal of biological chemistry* ;270(45) :26723-26726.

O

- Oliveira, N M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W M., Kolter, R., Kim, W., Foster, K R. (2015).** Biofilm Formation as a Response to Ecological Competition. *PLOS Biology*, 13(7).

O'May, C Y., Sanderson, K., Roddam, L.F., Kirov, S M., Reid, D W. (2009). Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *Journal of Medical Microbiology*, 58(6):765–773.

O'Toole G A., Kaplan H B., Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*; 54: 49- 79.

P

Park ,Y., Wallis ,DA. (1984). Steady-state performance of a continuous biofilm fermenter System for penicillin production. *Korean Journal of Chemical Engineering*; 1: 119–128.

Patriquin, G M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E P., Poole, K.

(2007). Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm

Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* ; 190(2) : 662–671.

Pierce, A., Legrand, D., Mazurier, J. (2009). La lactoferrine : une protéine multifonctionnelle. *Médecine/science* ; 25(4) : 361–369.

Portier,E.rôle du fer sur *Legionella pneumophila* et sur sa persistance dans les biofilms naturels. 253 p. Thèse de doctorat : Aspects moléculaire et cellulaires de la biologie :Pottiers : Université de Pottiers, 2014.

Q

Queck, S Y., Weitere , M., Moreno , AM.,Rice, Sa.,Kjelleberg, S .(2006) .The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol* ;8(6) :1017- 1025.

R

Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J P., Beauregard ,P B.(2019). Iron Homeostasis in *Bacillus subtilis* Requires Siderophore Production and Biofilm Formation. *Environmental Microbiology* ; 85 (3).

Roux, A .,Ghigo, J M. Les biofilms bactériens.groupe génétique des biofilms institut pasteur,16 mars 2006 France,268p.

Roux A., Ghigo J M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bull. Acad. Vét.* ; 159 (3) : 261-268.

S

Simoes, M., Lucia, C., Simoes, B., Maria, J., Vieira, B. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* ; 43: 573-583.

Stalder ,T ., Top ,E .(2016). Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities. *Npj Biofilms and Microbiome* ;2(16022).

T

Teixeira P.,Oliveira R. (2002). Metabolism of *Alcaligenes denitrificans* in biofilm vs planktonic cells. *Journal of Applied Microbiology* ; 92 : 256– 260.

Todd B Reynolds, Gerald R Fink .(2001). Bakers Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. *Science* ; 291(5505): 878 – 88.

Tomlin, KL., Malott ,R., Ramage ,G., Storey, Dg., Sokol, Pa., Ceri ,H .(2005). Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl environ microbial*;71(9):5208-5218.

Ton-That, H., Marraffini L. A ., Schneewind, O.(2004). Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* ; 1694(1-3): 269-278.

Tremblay ,Y., Hathroubi ,S., Jacques, M.(2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research* ;78(2) :110-116.

Tronnet ,S. Régulation par le fer et rôle de la colibactine dans la colonisation du tube digestif par *Escherichia coli*. 202 p. Thèse de doctorat, ED Biologie-Santé-Biotechnologies : Microbiologie. UNIVERSITÉ DE TOULOUSE, 2017.

V

Vaulont , S., Schalk , I. (2015). Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. *Médecine/sciences* ; 31(8-9) : 756.

W

Wandersman ,C., Delepelaire, P. (2004). Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology*; 58(1): 611–647.

Wu, Y., Outten ,F W. (2008). IscR Controls Iron-Dependent Biofilm Formation in *Escherichia coli* by Regulating Type I Fimbria Expression. *Journal of Bacteriology* ;191(4) ; 1248–1257.

Y

Yang, L., Barken, K B., Skindersoe, M E., Christensen, A B., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*; 153(5): 1318–1328.

Annexes

Annexes 1. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition**Annexe 1.1. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *P.aeruginosa***

N°	ATB testés	Abréviation	Charge (µg)	Diamètre critique (mm)		
				R	I	S
01	Ticarcilline	TIC	75	≤15	16-23	≥24
02	Pipéracilline	PIR	100	≤14	15-20	≥21
03	Pipéracilline + Tazobactam	TZP	110	≤14	15-20	≥21
04	Ceftazidime	CAZ	30	≤14	15-17	≥18
05	Cefepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
06	Aztréonam	ATM	30	≤15	16-21	≥22
07	Imipenème	IPM	10	≤15	16-18	≥19
08	Fosfomycine	FOS	200
09	Gentamicine	CN	15	≤12	13-14	≥15
10	Amikacine	AKN	30	≤14	15-16	≥17
11	Ciprofloxacine	CIP	5	≤15	16-20	≥21
12	Sulfamethoxazole + Triméthoprim	SXT	25
13	Colistine	CT	50	≤10	≥11
14	Chloramphénicol	CHL	30

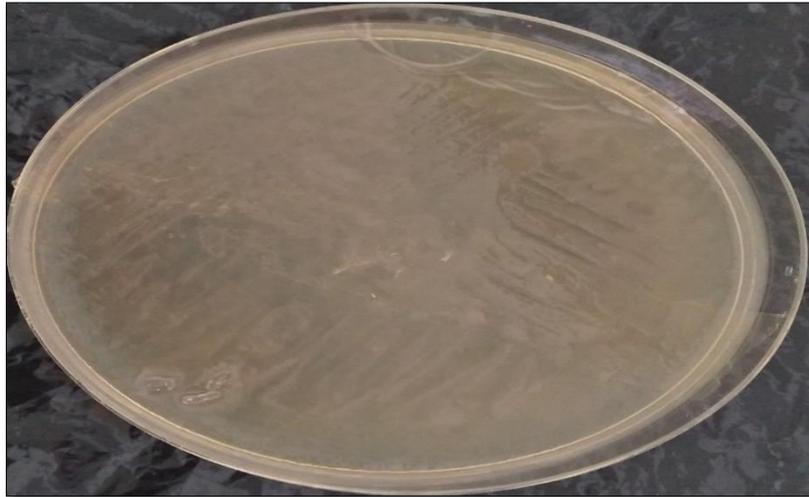
Annexe 1.2. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *S.aureus*

N°	ATB testés	Abréviation	Charge (µg)	Diamètre critique (mm)		
				R	I	S
01	Pénicilline	P	10	≤18	≥19
02	Ceftazidime	CAZ	30
03	Amoxicilline	AX	25
04	Gentamicine	CN	10	≤12	13-14	≥15
05	Amikacine	AK	10	≤14	15-16	≥17
06	Ciprofloxacine	CIP	5	≤15	16-20	≥21

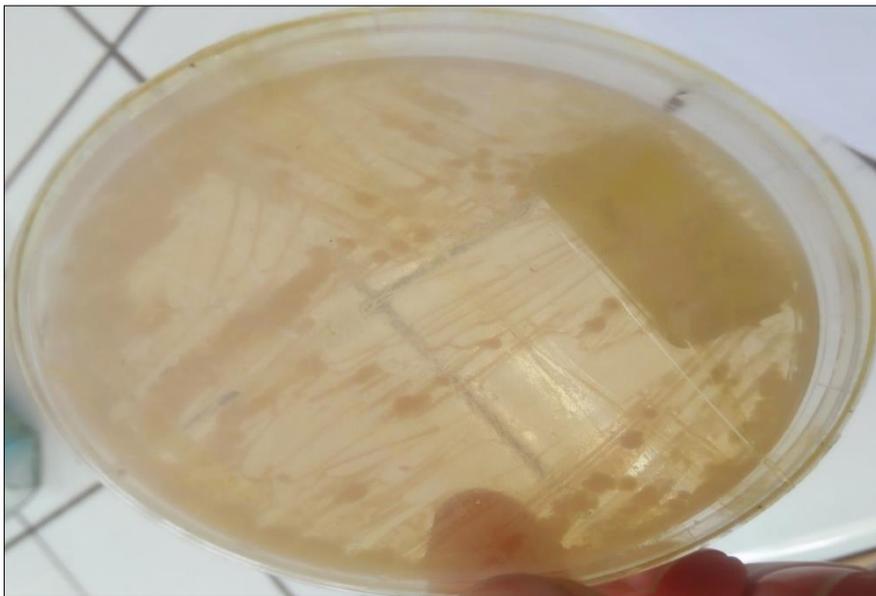
Tableau extrait du Document M100 – S24.Vol. 34, n°1. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; twenty-fourth informational supplement.
Extraits des recommandations 2014 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Annexes 2. Culture des bactéries sur la gélose Luria-Bertani (LB)

Annexe 2.1. Culture de *P.aeruginosa* sur Luria-Bertani agar



Annexe 2.2. Culture de *S.aureus* sur Luria-Bertani agar



Annexe 3 . préparation des milieux de culture et des solutions**Annexe 3.1 . préparation de LB agar**

- **LB agar 35g**
- **Eau distillée 1L**

Annexe 3.2 . préparation de LB broth

- **LB broth20g**
- **Eau distillée 1L**

Annexe 3.3 . préparation de la solution du cristal violet à 1%

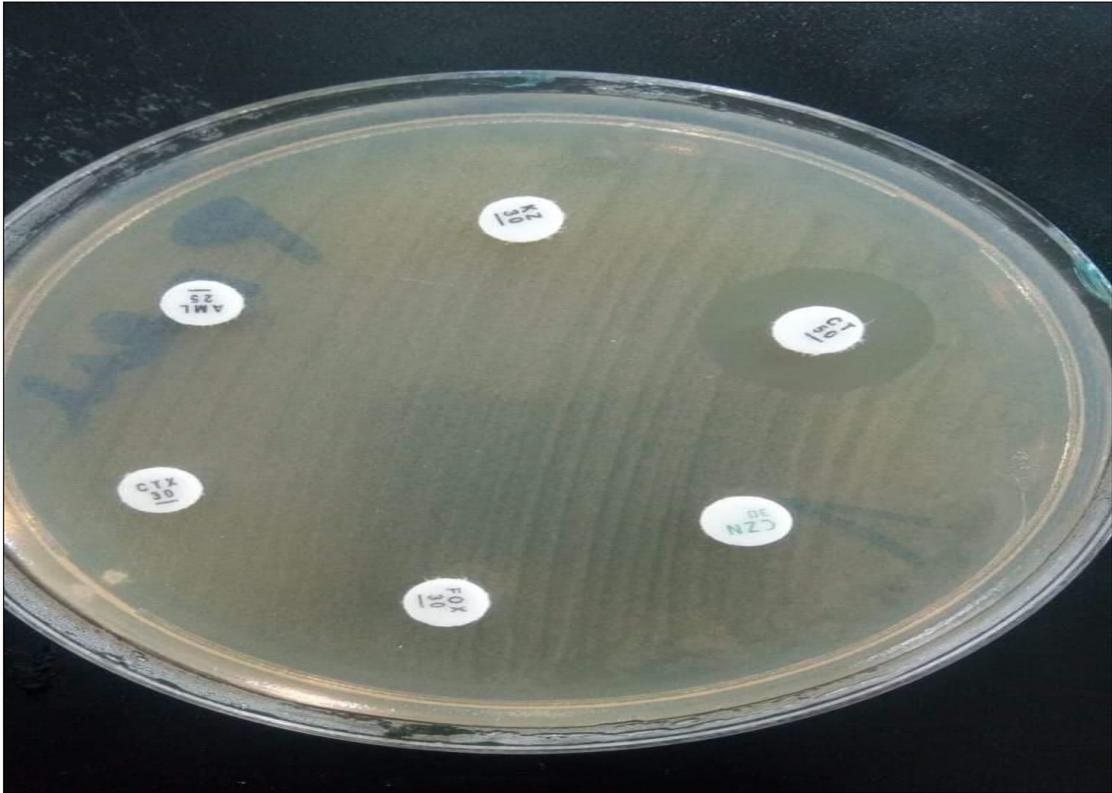
- **Cristal violet 1g**
- **Eau distillé 100ml**

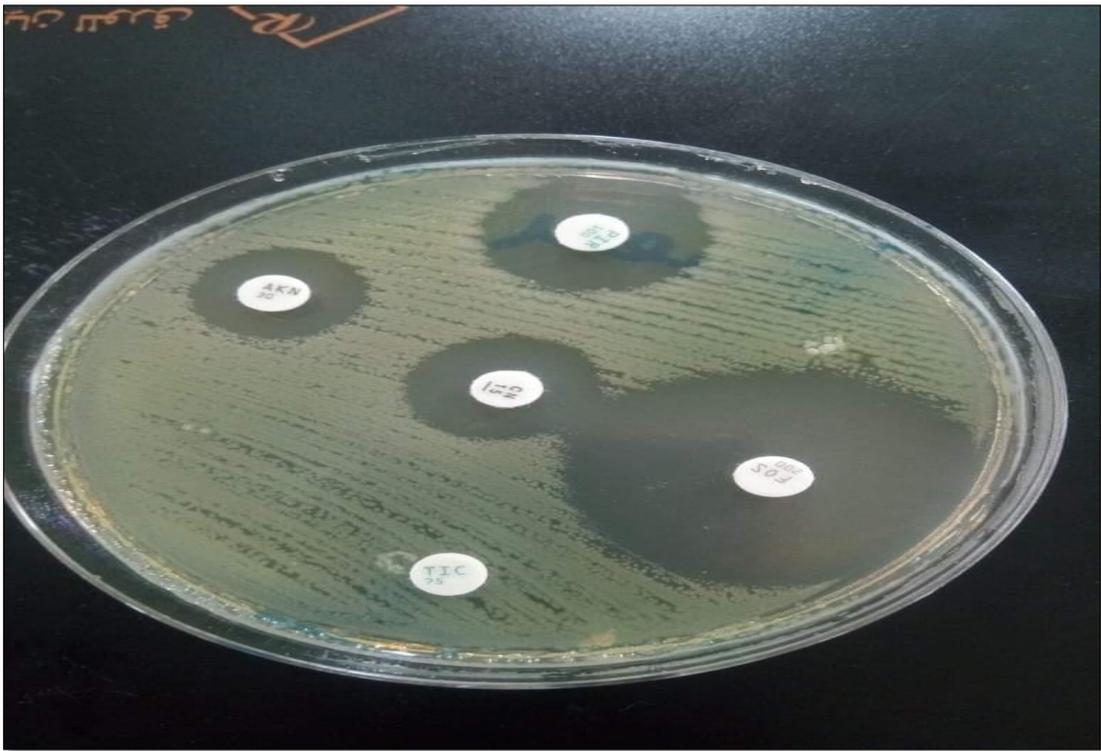
Annexe 3.4 . préparation de la solution éthanol-acétone (75-25)

- **Ethanol 75ml**
- **Acétone25ml**

Annexes 4. Résultats de l'antibiogramme de *P.aeruginosa* et *S.aureus*

Annexes 4.1. Résultats de l'antibiogramme de *P.aeruginosa*





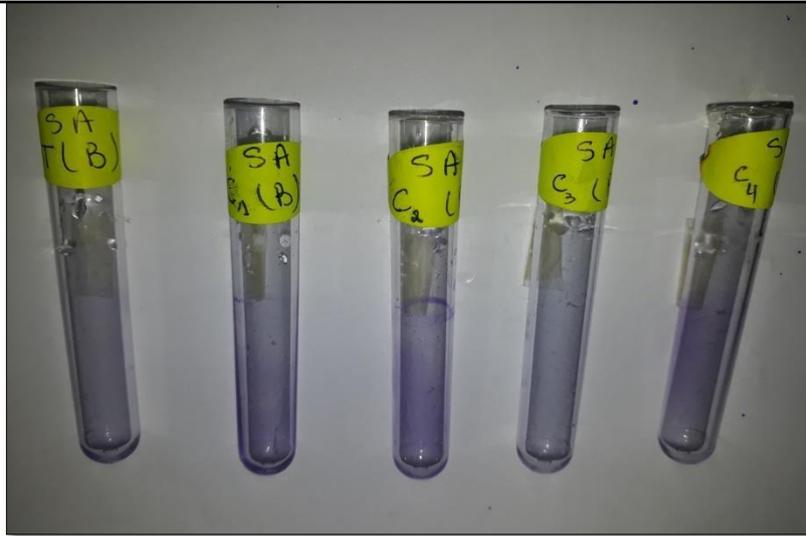
Annexe 4.2. Résultats de l'antibiogramme de *S.aureus*



Annexes 5. Aspects des tubes CV biofilm de *P.aeruginosa*
Annexe 5.1. Aspects des tubes CV biofilm de *P.aeruginosa* avant solubilisation dans l'alcool (éthanol/acétone)
0 μm 0.27 μm 0.55 μm 5.55 μm 11.11 μm
Annexe 5.2. Aspects des tubes CV biofilm de *P.aeruginosa* après solubilisation dans l'alcool (éthanol/acétone)
0 μm 0.27 μm 0.55 μm 5.55 μm 11.11 μm

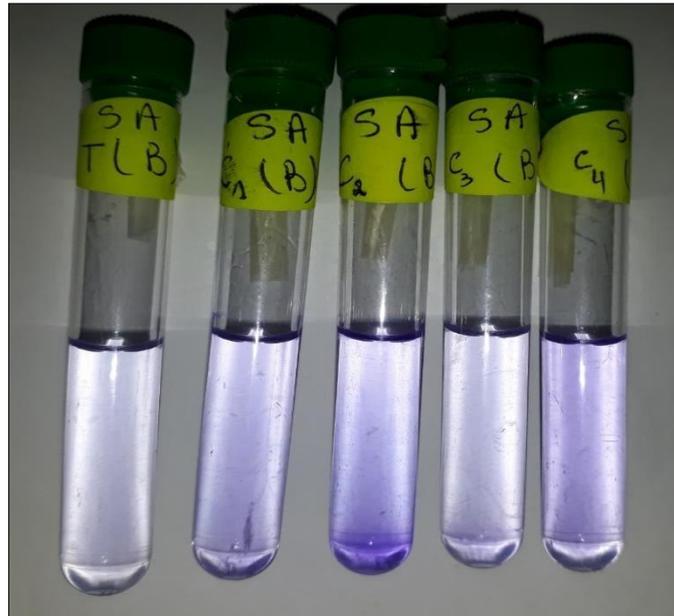
Annexes 6. Aspects des tubes CV biofilm de *S.aureus*

Annexes 6.1. Aspects des tubes CV biofilm de *S.aureus* avant solubilisation dans l'alcool (éthanol/acétone)



0 μ m	0.27 μ m	0.55 μ m	5.55 μ m	11.11 μ m
-----------	--------------	--------------	--------------	---------------

Annexes 6.2. Aspects des tubes CV biofilm de *S.aureus* après solubilisation dans l'alcool (éthanol/acétone)



0 μ m	0.27 μ m	0.55 μ m	5.55 μ m	11.11 μ m
-----------	--------------	--------------	--------------	---------------

Résumé

Les biofilms bactériens sont à l'origine d'infections multiples dans l'environnement hospitalier. Le fer est un élément essentiel aux processus cellulaires de l'hôte ainsi que la croissance bactérienne. En outre, il peut exercer une influence sur la formation de biofilms. Les biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Staphylococcus aureus* causent de graves problèmes en milieu médical à cause de leurs résistances aux antibiotiques. En effet, si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils s'avèrent bien moins efficaces sur les biofilms. L'objectif de ce travail vise à étudier l'effet du fer (FeCl_3) sur l'adhésion et la formation de biofilm de deux souches cliniques, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, en appliquant la méthode de coloration au cristal violet.

Les résultats obtenus ont montré que ces bactéries adhèrent sur tubes en polystyrène en présence du fer. Il a été également observé que l'addition de cet élément, à certaines doses dans le milieu de culture, s'est traduite par des augmentations suivies de réductions de l'adhésion bactérienne. En outre, les résultats indiquent que les biofilms formés présentent des comportements différents de ceux des bactéries planctoniques. En définitive, cette étude a permis de révéler et de confirmer la possibilité de l'intervention du fer dans la régulation de la production de biofilms bactériens.

Le développement des connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm ouvre ainsi une nouvelle voie dans la recherche de nouveaux outils thérapeutiques pour lutter contre les biofilms néfastes.

Mots-clés : biofilms bactériens, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, fer, cristal violet.

Abstarct

Bacterial biofilms cause multiple infections in the hospital environment. Iron is an essential element in the cellular processes of the host as well as bacterial growth. In addition, it can influence the formation of biofilms of *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Biofilms cause serious problems in the medical community because of their resistance to antibiotics. Indeed, if conventional antibiotic treatments are effective on planktonic bacteria, they are much less effective on biofilms. The aim of this work is to investigate the effect of iron (FeCl_3) on adhesion and biofilm formation of two clinical strains, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, applying the crystal violet staining method.

The results obtained showed that these bacteria adhere to polystyrene tubes in the presence of iron. It has also been observed that the addition of this element at certain doses in the culture medium has resulted in increases followed by reductions in bacterial adhesion. In addition, the results indicate that formed biofilms exhibit different behaviors from those of planktonic bacteria. In the end, this study revealed and confirmed the possibility of iron intervention in the regulation of bacterial biofilm production.

The development of knowledge on the mechanisms involved in the formation of biofilm thus opens a new path in the search for new therapeutic tools to fight against harmful biofilms.

Keywords: bacterial biofilms, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, iron, crystal violet.

الملخص

الأغشية الحيوية البكتيرية تسبب عدوى متعددة في بيئة المستشفى. الحديد هو عنصر أساسي في العمليات الخلوية للمضيف وكذلك نمو البكتيريا. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تؤثر على تشكيل الأغشية الحيوية للبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* هاته الأغشية الحيوية تسبب مشاكل خطيرة في الوسط الطبي بسبب مقاومتها للمضادات الحيوية. في الواقع، إذا كانت علاجات المضادات الحيوية التقليدية فعالة على بكتيريا الحرة، فهي أقل فعالية في الأغشية الحيوية.

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير الحديد ($FeCl_3$) على الالتصاق وتشكيل الأغشية الحيوية من سلالتين سريرييتين *P. aeruginosa* و *S. aureus*، وتطبيق طريقة التلوين بالكريستال البنفسجي CV.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن هذه البكتيريا تلتصق بأنابيب البوليبسترين في وجود الحديد. وقد لوحظ أيضاً أن إضافة هذا العنصر بجرعات معينة في وسط الاستزراع قد أدى إلى زيادات تليها انخفاضات في الالتصاق البكتيري. بالإضافة إلى ذلك، تشير النتائج إلى أن الأغشية الحيوية المشكلة تظهر سلوكيات مختلفة عن سلوكيات بكتيريا العوالق. في النهاية، كشفت هذه الدراسة وأكدت إمكانية تدخل الحديد في تنظيم إنتاج الأغشية الحيوية البكتيرية.

وهكذا فإن تطور المعرفة حول الآليات المشاركة في تكوين الأغشية الحيوية يفتح مساراً جديداً في البحث عن أدوات علاجية جديدة لمكافحة الأغشية الحيوية الضارة.

الكلمات المفتاحية: الأغشية الحيوية البكتيرية، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، الحديد، الكريستال البنفسجي.

THÈME : EFFET DU FER SUR LA FORMATION DE BIOFILMS BACTÉRIENS

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biologie moléculaire des microorganismes

Résumé

Les biofilms bactériens sont à l'origine d'infections multiples dans l'environnement hospitalier. Le fer est un élément essentiel aux processus cellulaires de l'hôte ainsi que la croissance bactérienne. En outre, il peut exercer une influence sur la formation de biofilms. Les biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Staphylococcus aureus* causent de graves problèmes en milieu médical à cause de leurs résistances aux antibiotiques. En effet, si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils s'avèrent bien moins efficaces sur les biofilms. L'objectif de ce travail vise à étudier l'effet du fer (FeCl_3) sur l'adhésion et la formation de biofilm de deux souches cliniques, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, en appliquant la méthode de coloration au cristal violet.

Les résultats obtenus ont montré que ces bactéries adhèrent sur tubes en polystyrène en présence du fer. Il a été également observé que l'addition de cet élément, à certaines doses dans le milieu de culture, s'est traduite par des augmentations suivies de réductions de l'adhésion bactérienne. En outre, les résultats indiquent que les biofilms formés présentent des comportements différents de ceux des bactéries planctoniques. En définitive, cette étude a permis de révéler et de confirmer la possibilité de l'intervention du fer dans la régulation de la production de biofilms bactériens.

Le développement des connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm ouvre ainsi une nouvelle voie dans la recherche de nouveaux outils thérapeutiques pour lutter contre les biofilms néfastes.

Mots clés : Biofilms bactériens, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Fer, cristal violet

Laboratoire de recherche : laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury : ABDELAZIZ Wided (MCB - UFM Constantine),
Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (MAA - UFM Constantine),
Examineur : MERGOUD Lilia (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 01/07/2019