République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université « Dr. Moulay Tahar » de Saida

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire présenté en vue de l'obtention

Du diplôme de Master en : Biologie

Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

Moussaoui Chahinez

Youcef Houaria

Biofilms microbiens, nouveaux progrès.

Soutenu le 20/09/2021 devant le jury composé de :

Président	Benreguieg Mokhtar	MCA	Université de Saida
Examinateur	Halla Noureddine	MCB	Université de Saida
Promoteur	Ghellai Lotfi	MCA	Université de Saida

2020-2021

Remerciement

Avant tout, un grand merci à "Allah" pour nous avoir donné lecourage et la volonté durant les moments difficiles.

Nombreux sont ceux qui nous ont aidé, encouragé, réconforté, soulagé, tout au long de ces années et nous ne saurions leur exprimer notre remerciement autant que nous le souhaiterions ;leurs discussions, leurs conseils, leur présence, nous furent éminemment précieux.

Nous tenons tout d'abord à remercier chaleureusement Mr. Ghellai L d'avoir accepté d'être notre encadreur de mémoire et nous avoir aidés à conduire ce travail jusqu'au bout. Nous lui sommes particulièrement reconnaissants pour sa disponibilité, sa compétence, son soutien, ses conseils judicieux et la confiance dont il nous a fait part lors de la réalisation de ce travail.

Nous remercions également les membres du jury , Mr Benreguieg M et Mr Halla N pour avoir accepté d'évaluer et de juger ce modeste travail.

Nous tenons à les remercier nous leurs sommesreconnaissants pour leur entière disponibilité, leur aide et leurs conseils inestimables.

Et pour être sûr de n'oublier personne, que tous ceux, qui de prèsou loin, ont contribué par leurs conseils, leurs encouragements ouleurs amitié, à l'aboutissement de ce modeste travail, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profondes reconnaissances.

Chahinez, Houaria.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:
À Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.

À la mémoire de mon cher père, qu'Allah ait son âme.

À La personne la plus chère à mon cœur : Maman qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie …, Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi ; je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté. Tu m'as aimé très profondément et tu as été toujours une mère idéale. Tu es la seule qui comprend ma vie : Je te demande pardon et encore une fois Merci.

À Ma chère binôme et sa famille.

À mes amis et à toutes les personnes qui j'aime…

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

Chahinez

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

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

À mes chers parents ,Vous avez su m’apprendre modestement les vraies valeurs de la vie.et vos encouragements ont toujours été sans faille tout au long de ce parcours de longue haleine. La confiance que vous m’accordez me permet d’avancer.

À mes adorables souers, Nawal, Rania ainsi que ses époux qui ont toujours été présents dans les moments les plus difficiles malgré la distance qui nous sépare.

Spéciale dédicace à Gacemi Mohamed Amine ,Brahimi Abed ALI

À mon binome, Moussaoui Chahinez

À mes chères proches amis (es),Qui ont vécu avec moi les meilleurs moment ainsi que les mauvais durant ma vie et surtout Hadjira; Nawal et Rachida.

Et à tous ceux qui comptent pour moi.

« Merci ».

Houaria

ملخص :

البيوفيلم عبارة عن مجتمع منظم من الكائنات الحية الدقيقة ، يلتصق بسطح خامل أو حي ويتم تجميعه داخل مصفوفة عديدات السكاريد الخارجية اللاصقة والوقائية التي تفرزها. يمكن أن تتكون الأغشية الحيوية من نوع واحد أو أكثر من الكائنات الحية الدقيقة تشارك الأغشية الحيوية في مجالات مختلفة ، مثل الغذاء ، والطب الحيوي ، والبيئة ، والتكنولوجيا الحيوية ، إلخ.....

كان الهدف من هذه الدراسة هو إنشاء كتيب يحتوي على مفاهيم عامة عن الأغشية الحيوية البكتيرية ودورها في القطاع الطبي الحيوي والصناعي.

الكلمات المفتاحية: الأغشية الحيوية ، البكتيريا ، الصناعات الغذائية ، الطب الحيوي ، التكنولوجيا الحيوية.

RÉSUMÉ

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice qu'ils sécrètent. Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes. Les biofilms sont impliqués dans différents domaines, l'agroalimentaire, le biomédical, l'environnement, la biotechnologie, etc… .

Le but de cette étude était d'établir un fascicule comportant les notions générales sur les biofilm bactériens et leur rôle dans le secteur biomédical et industrie.

Mots-clés: biofilms, bactéries, industrie agroalimentaire, biomedical, biotechnologie

SUMMARY

The biofilm is a structured community of microorganisms, attaching to an inert or living surface and gathered within an adhesive and protective exopolysaccharide matrix that they secrete.A biofilm can consist of one or more species of microorganisms. Biofilms are involved in different fields, food, biomedical, environment, biotechnology, etc.

The aim of this study was to establish a booklet comprising general notions on bacterial biofilms and their role in the biomedical and industrial sector.

Keywords: biofilms, bacteria, food industry, biomedical, biotechnology

Table des matières

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ……..1

Chapitre I. Généralités sur les biofilms

I.1.Historique…….3

I.2.Définition……..3

I.3.Composition du biofilm……3

I.4. Structure et propriétés du biofilm……5

I.5.Etapes de formation des biofilms……7

I. 5.1.L'adhérence réversible……7

I.5.2.L'adhérence irréversible……....7

I.5.3.Le développement précoce du biofilm……..7

I.5.4.La maturation du biofilm…….……..8

I.5.5.Le détachement de bactéries…….…….9

I.6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm……...…….….9

I.6.1.Caractéristiques de la surface …….....10

I.6.2.Rugosité de la surface……...……...10

I.6.3.Propriétés physico-chimiques de la surface……...…..10

I.6.4.Présence de films protéiques sur la surface……..10

I.6.5.Caractéristiques du milieu……10

I.6.6.Propriétés des cellules……..12

Chapitre II : Biofilms dans le secteur médical

II.1.Résistance des bactéries au sein des biofilms……13

II.1.1.Résistance aux défenses de l'hôte…….....13

II.1.2.Résistance aux antibiotiques et désinfectants…….…14

II. 1.2.1.Le défaut de pénétration de l'antibiotique……..14
II.1.2.2.La croissance ralentie des bactéries…….14
II.1.2.3. La réponse des bactéries à un stress…….…...15
II.1.2.4. La persistance de bactéries…….....15
II.2. Biofilms bactériens et risque infectieux : bactéries en cause, les virus aussi……..…..16
II.3. Biofilm et infections sur matériel…….….19
II.3.1. Les biofilms associés aux orthopédiques ……..……20
II.3.2.Les biofilms associés aux cathéters ……..……..21
II.3.3.Les biofilms associés aux implants cardiovasculaires…….……23
II.3.4. Les biofilms associées aux implants ophtalmiques ……....23
II.3.5 Les biofilms associée à la ventilation……..…23
II.4.Analyse des biofilms sur les matériaux……..….24
II.4.1. Extractions des biofilms……..……...24
II.4.2. Les différentes techniques d'analyse……..……....25
II.4.3. Méthodes expérimentales…….……..25
II.4.4. Méthode européenne harmonisée……....26
II.5. Prévention et traitement des infections liées aux biofilms…….28
II.5.1. Moyens de lutte contre la formation des biofilms……..…….28
II.5.1.1. Les dispositifs imprégnés de substance hydrophile……...…...28
II.5.1.2. Les dispositifs imprégnés d'argent ou de substances antimicrobiennes…….....28
II.5.1.3 Les agents chélateurs…….…..…..29
II.5.1.4. L'éthanol……..….29
II. 5.2.Techniques d'élimination du biofilm……..…….29
II.5.2.1. L'antibiothérapie……..…….30
II.5.2.2.Cibler la matrice exopolysaccharidique……..….....30
II.5.2.3. Cibler les bactéries persistantes……...……..31
II.5.2.4. Inhiber le quorum sensing……..31

Chapitre III :Biofilms dans L'industrie

III.1. Contexte général…….32
III.2. Le modèle su biofilm industriel……..33
III.3. Le biofilm en industrie laitière……....34

III.4. Les facteurs influençant l'attachement aux surfaces industrielles…….34
III.5. L'hydrophobicité et la topographie du support…….…….35
III.6. Les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries……...39
III.7.La microflore du biofilm en industrie laitière…….....40
III.8..Nettoyage parfait……....40
III.9.Les agents de nettoyage……...…41
III.10.La désinfection……..43
Chapitre IV : Les applications de biofilm
IV .1. Les biofilms dans le traitement des eaux usées ……...….44
IV .2.Biofilms dans la biorémédiation…….……...46
IV.2.1. Approches de la biorémédiation……..46
IV.2.2.Rôle des biofilms dans la biorémédiation…….....47
IV.2.3.Application des biofilms pour la biorémédiation des métaux lourds…….…..48
IV.2.4.Applicationdes biofilms pour la biorémédiation des colorants…….……...49
IV.3. Biofilm électroactifs…….……..49
Conclusion …….…….....53
Références…….……..54

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AFM : Microscopie de force atomique

ATP : Adénosine triphosphate

B.cereus : *Bacillus cereus*

BPP : Pouvoir de production de biomasse

CAUTIs : Catheter-Associated Urinary Tract Infections

CIP : Cleaning -in-place

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

C/N : carbone/azote

CO_2 : Dioxyde de carbone

CVC : Cathéters veineux centraux

C° : Degré Celsius

DO : Densité Optique

EA : Electroactif

E.coli : *Escherichia coli*

EDTA : E thylène Diamine Tétraacétique Acide

EPS : Exopolysaccharides

Gram - : Gram négatif

Gram+ : Gram positif

LPS : LipoPolySaccharides

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistante à la Méticilline

OMS : Organisation mondiale de santé

PAC : Pile à combustible

PCR : Polymerase chain reaction

PH : Potontiel d'Hydrogene

PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin

PGA: Poly-β -1,6-N-acétylglucosamine

PVA : Pneumonie sous ventilation assistée

PVC : Polychlorure de Vinyl

Ra : Rugosité arithmétique

Rq : Rugosité quadratique moyenne

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SBP : Concentration de biomasse en suspension dans l'eau

QS : Quorum Sensing

% : Pourcentage

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm …….....9

Figure02: Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte……..…….13

Figure 03 : Hypothèses de mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques…….…....16

Figure04 : Séquences des événements dans la formation des biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments ……...……33

Figure 05: Micrographe en MEB de surfaces en inox avec différents finis de surface. A : sans traitement de polissage, B :polissage 80 grit, C :polissage 120 grit, D :électro polissage ……..…….36

Figure 06: Adhésion de différents microorganismes sur des surfaces en acier inoxydable……..……36

Figure 07: Influence des caractéristiques de surface et de l'orientation des bactéries sur le nombre de cellules retenues……..……37

Figure 08: Des essais de rétention de bâtonnet sur des surfaces en oxide de titanium avec des caractéristiques topographiques de (a)0.5µm et(b)2µm……38

Figure 09: Micrographes électroniques d'*E.coli* retenu sur une surface en inox(a) non recouvert et (b) recouvert de Titanium montrant que les nombres de cellules sont nettement plus faible sur l'inox conditionné de Titanium……..39

Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne…….…50

Figure 11 : Schéma de la pile à combustible microbienne en sédiments marins ……...51

Liste des tableaux

Tableau01 : Principaux constituants de la matrice du biofilm…….……..5

Tableaux02 : principales bactéries impliquées dans le développement des infections chroniques liées aux biofilms chez l'homme……...19

Tableau 03 : Élimination de divers métaux lourds en utilisant une biomasse bactérienne…….48

Tableau 04 : Élimination de divers colorants toxiques en utilisant une biomasse bactérienne…….49

INTRODUCTION

Introduction

Les microorganismes ont été la première forme de vie sur notre planète. Ils rassemblent les bactéries (procaryotes) les levures, les algues, les champignons et les protozoaires. Ces êtres vivants sont ubiquitaires, colonisant sols, eaux douces et marines et atmosphère, et sont associés les uns aux autres par des relations adaptées à leurs besoins biologiques. Ils sont indispensables à l'homme et à l'environnement en contribuant aux grands cycles de la matière et en jouant un rôle essentiel dans presque tous les écosystèmes, naturels et humains, Dès qu'une surface est immergée dans un fluide, elle peut être colonisée par des microorganismes et être recouverte d'un biofilm.

Depuis plusieurs années, les biofilms sont la cible d'importantes recherches montrant que leurs propriétés biologiques sont aussi diverses que les organismes qui les constituent et qu'il existe une multitude d'environnements dans lesquels ils peuvent se développer. Ils peuvent se développer sur n'importe quel type de surface naturelle ou artificielle, qu'elle soit minérale (roche, interfaces air-liquide...), organique (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielle (canalisations, coques des navires) ou médicale (prothèses, cathéters, sondes urinaires….).Ce système, appelé « biofilm », s'avère une structure complexe formée grâce à l'agglomération des microorganismes, facilitée par les matières polymériques qu'ils excrètent. Au sein des biofilms, les micro-organismes sessiles développent des caractéristiques très différentes de celles des micro-organismes libres, planctoniques : mise en oeuvre d'expressions génétiques spécifiques caractérisées par un changement radical de phénotype et par l'acquisition de propriétés spécifiques aux biofilms, notamment l'antibiorésistance et l'expression de facteurs de résistance à de nombreux stress environnementaux, utilisation de systèmes de communication chimique, modifications structurales, production d'exopolymères, etc. Ces modifications échappent aux méthodes d'investigation de la microbiologie traditionnelle en suspension.

Le mode de vie en biofilms offre de nombreux avantages pour la survie et la multiplication de l'écosystème bactérien mais pose de gros problèmes pour l'homme et ses activités industrielles. Le présent manuscrit est structuré en quatre chapitres dont :

Le premier est consacré à une revue bibliographique traitant des généralités sur le biofilm bactérien et les étapes de leur formation.

Le deuxième chapitre présente les biofilms dans le secteur médical, les biofilms ont une importance particulière car ils sont associés à des problèmes majeurs de santé publique et

impliqués dans un large éventail d'infections chez l'homme. Environ 65 % des infections sont dues à des biofilms dans les pays dits développés. Les biofilms sont aussi impliqués dans 60 % des infections nosocomiales et dans toutes les infections prothétiques **(Roux et Ghigo, 2006).** Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, sondes urinaires, prothèses vocales…) ou encore les muqueuses du corps humain.

Dans le troisième chapitre, nous présentons le contexte des industries alimentaires, toute contamination microbienne résidant sur une surface peut être considérée comme un biofilm. La caractéristique fondamentale des micro-organismes colonisant les surfaces est leur grande résistance aux opérations de nettoyage et de désinfection.

Dans le dernier chapitre, nous présentons les applications de biofilm et les aspects positifs des biofilms, les biofilms jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus : ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. Dans le cas de la bioremédiation, les biofilms servent au traitement des déchets en transformant les matières organiques et inorganiques toxiques ou indésirables en sous-produits bénins (Fuchs et al, 1996). On peut citer comme exemple la réduction ou l'oxydation des contaminants de l'eau.

Chapitre I : Généralités sur les biofilms

1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de micro-organismes au niveau de ses dents **(Donlan et al,2002).**

En 1932 ;***Henerici*** observa des communauté bactériennes fixées sur des lames lors d'une expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium .Il émit alors une hypothèse que la plupart des bactéries vivant dans des milieux aqueux ne sont pas sous forme planctonique, mais plutôt organisée sous forme de communauté sessile fixe à une surface **(Henerici,1932) ;(trautner et al ,2009).**

Le terme « biofilm » a été proposé pour la première fois par **(Costerton, 1978)** et son équipe, en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes. Depuis, un nombre croissant d'études ont été consacrée au biofilms, aussi bien dans le domaine industriel et environnemental que dans le domaine médical. Le nombre de publications scientifiques annuelle consacrées aux biofilms est passé d'une dizaine en 1996 à plus de1200 en 2002 **(Donlan et al, 2002).**

2. Définition

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice qu'ils sécrètent. C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement .Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes **(Auger, 2012).**

3. Composition du biofilm

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les microorganismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent 2à15% du matériel du biofilm ; alors que la matrice extracellulaire représente 50 à90% de la masse organique carbonée d'un biofilm **(Sutherland, 2001b)**.

L'organisation d'un réseau de canaux aqueux au sein du biofilm permet l'acheminement de l'oxygène et des nutriments entre les microcolonies et vers les régions les plus enfouies, ainsi que l'évacuation des déchets. Toute fois, un gradient de nutriments et d'oxygène existe depuis la superficie vers la profondeur du biofilm, ou l'environnement devient plus propice aux organismes évoluant en anaérobiose. Ainsi, l'état métabolique d'une bactérie au sein du biofilm peut être directement dépendant de sa localisation à l'intérieur de la structure **(O'Toole et al .,2000) ;(Clutterbuck et al.,2007).**

Le rapport C/N (carbone /azote) d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice. Cette matrice est fortement hydratée et est formée essentiellement des exopolysaccharides EPS).L'expression « substances polymériques extracellulaire »regroupe différentes classes de macromolécules présentes à l'intérieur des biofilms :des polysaccharides ,des protéines, des acides nucléiques, des lipides et d'autres macromolécules dites substances humiques(ce sont essentiellement les sécrétions de haut poids moléculaire)ainsi que les produits des lyses cellulaires et de l'hydrolyse de macromolécules. Des composants inorganiques ont été également trouvés dans la matrice extracellulaire (tableau01).

La composition des EPS est très différente d'un biofilm à l'autre. Elle dépend de la nature des microorganismes présents dans le biofilm, de l'âge du biofilm et des différents facteurs environnementaux comme les forces hydrodynamiques, la température et la disponibilité de nutriments et leur nature **(De Chalvet De Rochemonteix,2009)**.

La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural important et ses propriétés physico-chimiques sont variables d'un biofilm à l'autre. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet à certains biofilms de lutter contre la dessiccation dans le milieu naturel, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages.

Tableau01 : Principaux constituants de la matrice du biofilm **(Sutherland,2001b).**

Constituants	En % de la matrice
Eau	Jusqu'a 97%
Cellules de microorganismes	2 - 5 % (plusieurs especes)
Polysaccharides (homo and héteropolysaccharides)	1-2% (neutra et polyanionique)
Protéines (extracellulaires et resultants de la lyse)	< 1-2 % (plusieurs, y compris enzymes)
AND et ARN	< 1-2 % (from lysed cells)
ligand d'une enzyme	(liées et libres)

La matrice joue un rôle majeur dans les propriétés de résistance aux biocides des biofilms, en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm **(Donlan et Costerton,2002).**

4. Structure et propriétés du biofilm

Un biofilm mature est formé de micro-organismes (représentant environ 10% du biofilm) recouverts d'une matrice exopolymérique (EPS) produite par les micro-organismes contenus dans le biofilm, qui contient des protéines, des acides nucléiques, des lipides et des polysaccharides séparés par des canaux d'eau**.** En fonction de l'environnement dans lequel le biofilm se développe, la matrice peut également contenir des particules issues de la corrosion du substrat ou des composants sanguins. Les canaux d'eau sont vitaux pour la survie du biofilm formé, permettant le flux de nutriments et de produits métaboliques se partageant au sein de la communauté du biofilm **(Stoica et al,2017).**

L'EPS représente 50-90% du total des atomes de carbone organique de la structure du biofilm et est représenté par des polysaccharides qui sont différents en termes chimiques et physiques, certains d'entre eux étant des polysaccharides neutres ou polyanioniques (par exemple, l'EPS des bactéries Gram-négatives**.** La présence d'acide uronique (acide D-glucuronique, acide D-galacturonique et acide mannuronique) et d'anion pyruvate influence les

propriétés du biofilm**,** en liant les cations divalents tels que les ions calcium et magnésium, qui contribuent à la stabilisation du biofilm **(Stoica et al,2017).**

Dans le cas des biofilms de bactéries Gram-positives, la composition de l'EPS est différente et peut avoir un caractère cationique ont montré que le facteur slime produit par les staphylocoques coagulase-négatifs consiste en un acide teichoïque mélangé à de petites quantités de protéines. Par la suite, le slime a été choisi pour désigner le glicocalix ou EPS produit par des souches de staphylocoques coagulase-négatifs (*S. epidermidis*) ayant de fortes propriétés d'adhérence et isolées d'implants médicaux infectés **(Stoica et al,2017).**

La quantité d'EPS présente dans un biofilm augmente avec l'âge du biofilm. La matrice EPS influence l'adhésion microbienne à la surface du substrat et contribue à la résistance du biofilm aux agents antimicrobiens, empêchant le transport des antibiotiques à l'intérieur du biofilm, peut-être en liant ces agents**.** Dans certains cas, la résistance aux antibiotiques des microorganismes contenus dans le biofilm peut être 1000 fois supérieure à celle des cellules planctoniques **(Stoica et al,2017).**

Dans ce contexte, il n'est pas surprenant que les infections chroniques associées aux biofilms soient résistantes aux antibiotiques, et aux mécanismes de clairance de l'organisme hôte**.** La matrice EPS protège le biofilm des facteurs physico-chimiques de l'environnement externe, par conséquent, les biofilms microbiens ont une résistance accrue à l'action des toxines et des désinfectants **(Stoica et al,2017).**

En discutant la structure du biofilm en général, chaque biofilm a une structure unique, influencée par plusieurs facteurs, tels que la surface du substrat, les propriétés de l'interface, la disponibilité des nutriments, la composition de la communauté microbienne, l'architecture de la matrice polymère tridimensionnelle (la zone dense, la présence de pores et de conduits), et l'hydrodynamique (caractéristique exclusive de l'environnement dans lequel les biofilms se développent) **(Stoica et al,2017).**

La structure d'un biofilm peut varier d'un film à surface lisse à une structure hétérogène en mosaïque ou à une structure plus complexe comprenant des agrégats séparés par des canaux d'eau, considérée comme l'architecture la plus typique des biofilms. **(Stoica et al,2017).**

5. Etapes de formation des biofilms

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement. Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces, incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industriels, ou sur tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation des biofilms **(figure1)** :

5.1. L'adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles).Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide **(Auger, 2012).**

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

5.2. L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E.coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface **(Auger, 2012).**

5.3. Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entres elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique. **(Auger, 2012).**

5.4. La maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies, permettent l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets. La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des tissus environnants de l'hôte et permet ainsi la libération de nutriments. Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de micro-organismes. La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%)et inclue également des polymères d'exopolysaccharides, des protéines.des acides nucléiques, des phospholipides.des nutriments et des métabolites. Cette matrice a un rôle protecteur et un rôle structural. **(Auger, 2012).**

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une évolution du profil d'expression de leurs gènes. Ainsi, chez *E.coli,* on note une différence d'expression des gènes de 38% entre les bactéries attachées aux biofilms et les bactéries planctoniques. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé le quorum sensing**.** Ce système est fondé sur la production de molécules diffusibles par les bactéries, par exemple les acyl-homosérine lactones chez les bactéries à Gram négatif, qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné **(Auger, 2012).**

Les biofilms matures possèdent une structure tridimensionnelle avec plusieurs microenvironnements différents qui évoluent selon l'osmolarité, le pH et la densité cellulaire. Du fait de cette hétérogénéité. L'état métabolique d'une bactérie diffère selon sa localisation : il existe une variété de phénotypes bactériens au sein d'un biofilm.

Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal de matériel génétique. Ce phénomène pourrait notamment faciliter la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques **(Auger, 2012).**

5.5. Le détachement de bactéries

La densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 cellules/cm^2.Des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. 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 seuls ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués. Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries **(Auger, 2012).**

Ainsi, un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces.

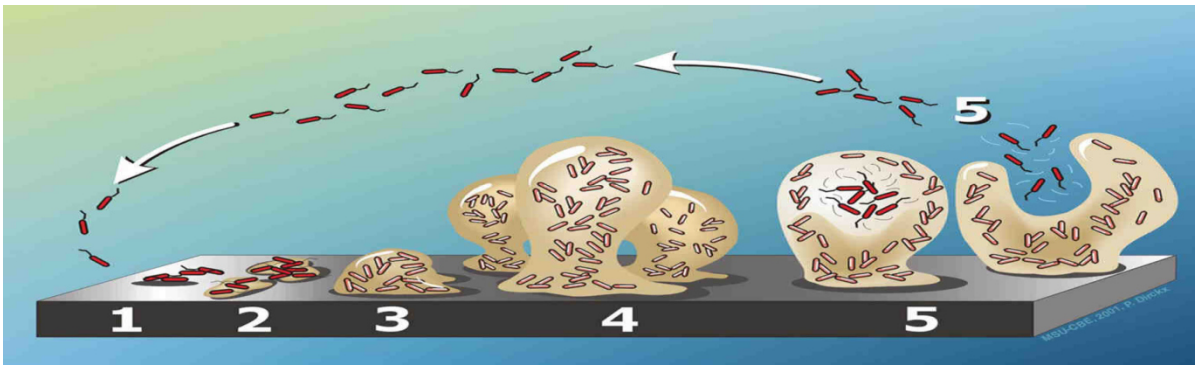

Figure 01 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm **(VanHoudt et Michiels, 2005).**

6. 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, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristique du milieu et propriétés de la surface des cellules **(Chibi, 2015).**

6.1. Caractéristiques de la surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influents sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm **(Chibi, 2015).**

6.2. Rugosité de la surface

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies 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 souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques **(Chibi, 2015).**

6.3. Propriétés physico-chimiques de la surface

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matièrespastiques.que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux **(Chibi, 2015).**

6.4. 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, le salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface et favorise la formation de biofilms **(Chibi, 2015).**

6.5. Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs **(Chibi, 2015).**

-La température : est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physico-chimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des micoorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion **(Chibi, 2015).**

- Le pH :du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation(protonation, déprotonation)des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion **(Chibi, 2015).**

-Concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.
- Sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation **(Chibi, 2015).**

- 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 **(Chibi, 2015).**

- Concentrations en certains cations : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na+, Calcium Ca2+,ion ferrique Fe3+) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens*sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre **(Chibi, 2015).**

- 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 micro-organismes de se fixer sur une surface ; puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide **(Chibi, 2015).**

6.6. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes **(Chibi, 2015).**

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 : flagelle, fimbriae, polysaccharides. Il peut y voir 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 Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysacchardies et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles **(Chibi, 2015).**

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse).L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation .Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité. Basse température, faible disponibilité du milieu an azote, phosphate, fer et croissance ralentie **(Chibi, 2015).**

Chapitre II : Biofilms dans le secteur médical

1. Résistance des bactéries au sein des biofilms

1.1. Résistance aux défenses de l'hôte

Les bactéries planctoniques qui pénètrent dans l'organisme vont stimuler la réponse immunitaire de l'hôte. Les phagocytes et les anticorps produits vont pouvoir les éliminer et contrôler l'infection aiguë (**Figure 2**, étape a). Les bactéries ayant formé un biofilm stimulent également la réponse immunitaire mais son efficacité est limitée par défaut de pénétration des phagocytes et des anticorps dans la matrice du biofilm (**Figure 2**, étape b). Les phagocytes vont libérer leurs enzymes phagocytaires sur place (**Figure 2**, étape c), ce qui induit une réponse inflammatoire qui endommage les tissus environnants et libère des bactéries du biofilm (**Figure 2**, étape d). Une bonne immunité cellulaire et humorale ne suffit donc pas pour éliminer un biofilm.

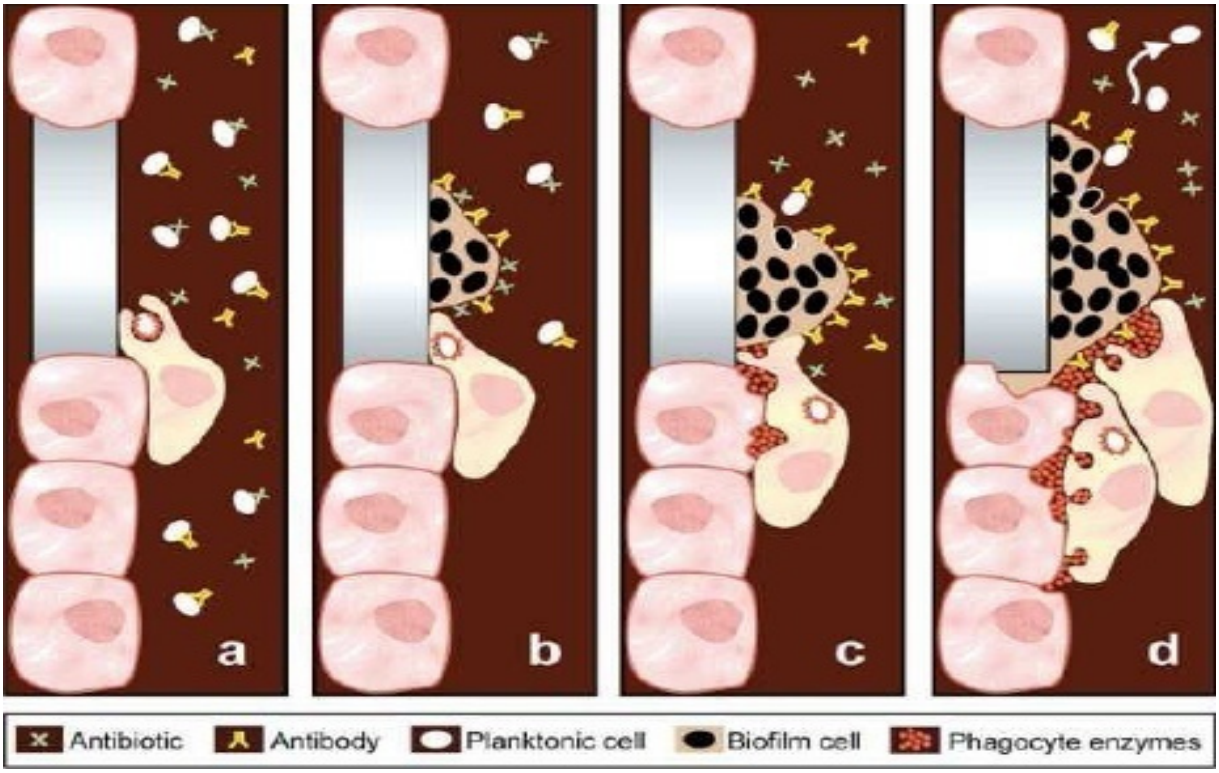

Figure02: Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte **(Costerton *et al*, 1999).**

1.2. Résistance aux antibiotiques et désinfectants

Les bactéries vivant au sein du biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques et désinfectants que leurs homologues planctoniques**.** Les concentrations d'antibiotiques nécessaires pour inhiber les bactéries au sein d'un biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique **.**Ainsi, le traitement antibiotique est généralement efficace contre les bactéries planctoniques libérées du biofilm mais ne permet pas l'élimination complète du biofilm. Ce phénomène est un élément clé de la persistance des infections chroniques liées aux biofilms, créant un sérieux problème de Santé publique **(Auger, 2012)**. Plusieurs mécanismes sont impliqués :

1.2.1. Le défaut de pénétration de l'antibiotique

Le premier mécanisme de résistance est lié au défaut de pénétration des agents antimicrobiens dans les profondeurs du biofilm. Les multiples couches de cellules et les exopolysaccharides constituent une structure complexe et compacte que les antibiotiques et désinfectants ont du mal à traverser. Dans le cas des petites molécules, cette barrière permet uniquement de ralentir le passage. Pour les molécules chargées positivement comme les aminosides, la diffusion pourrait être limitée par leur liaison aux exopolysaccharides de la matrice qui sont chargés négativement**.** De plus, le retard de pénétration des molécules peut aussi favoriser l'activité inhibitrice des enzymes produites par les bactéries comme les β-lactamases.

Une diminution significative de la pénétration de β-lactamines, des glycopeptides et des aminosides a été rapportée mais de tels résultats n'ont pas été toujours retrouvés ; certains antibiotiques comme les fluoroquinolones, les tétracyclines, la fosfomycine ou la rifampicine semblent parfois bien pénétrer dans les biofilms **(Auger, 2012).** Ainsi, d'autres mécanismes de résistance doivent intervenir.

1.2.2. La croissance ralentie des bactéries

Il existe un gradient de sensibilité aux antibiotiques de haut en bas du biofilm. En effet, les bactéries au sein du biofilm ont un métabolisme hétérogène : celles en surface ont un meilleur accès à l'oxygène et aux nutriments, elles synthétisent plus de protéines et ont une croissance plus active que les bactéries situées en profondeur du biofilm**.** Ces dernières ont un métabolisme ralenti et un taux de croissance faible ou nul, elles sont dites en dormance. Or, les antibiotiques

sont plus efficaces sur les bactéries en division. De plus, le manque d'oxygène en profondeur du biofilm réduit l'activité antimicrobienne des aminosides **(Auger, 2012).**

1.2.3. La réponse des bactéries à un stress

Dans un biofilm, les bactéries subissent des adaptations phénotypiques pouvant mener à une augmentation de la résistance aux agents antimicrobiens. Ces modifications résultent de l'expression de gènes spécifiques en réponse aux conditions environnementales. Par exemple, les bactéries au sein d'un biofilm peuvent augmenter leur capacité d'expression de leur β-lactamase chromosomique suite à une exposition prolongée aux β-lactamines **.** Un autre exemple concerne les entérobactéries synthétisant un facteur sigma RpoS, sous la dépendance du régulon RpoS, en réponse à différents stress. Ce facteur a un rôle régulateur clé dans la survie bactérienne et dans la résistance généralisée à différents stress. Les biofilms à *E. coli* ayant une délétion du gène RpoS ont une densité plus faible. Les modifications phénotypiques peuvent aussi toucher les cibles habituelles des bactéries planctoniques, comme la paroi bactérienne, diminuant ainsi l'efficacité des antibiotiques. Par ailleurs, l'induction de l'expression de gènes codant pour les pompes d'efflux, systèmes permettant aux bactéries d'éliminer des molécules toxiques, pourrait être un autre mécanisme expliquant la résistance aux agents antimicrobiens mais leur impact n'a pas encore été clairement défini **(Auger, 2012).**

1.2.4 La persistance de bactéries

Une dose croissante d'antibiotique entraine une décroissance initiale du nombre de bactéries vivantes dans un biofilm, jusqu'à un seuil au-delà du quel l'augmentation des doses n'augmente plus le nombre de bactéries tuées, car une population de bactéries persiste quelle que soit la dose administrée. Ce taux de bactéries persistantes serait plus important dans les biofilms que chez les bactéries planctoniques, notamment en profondeur du biofilm **(Auger, 2012).**

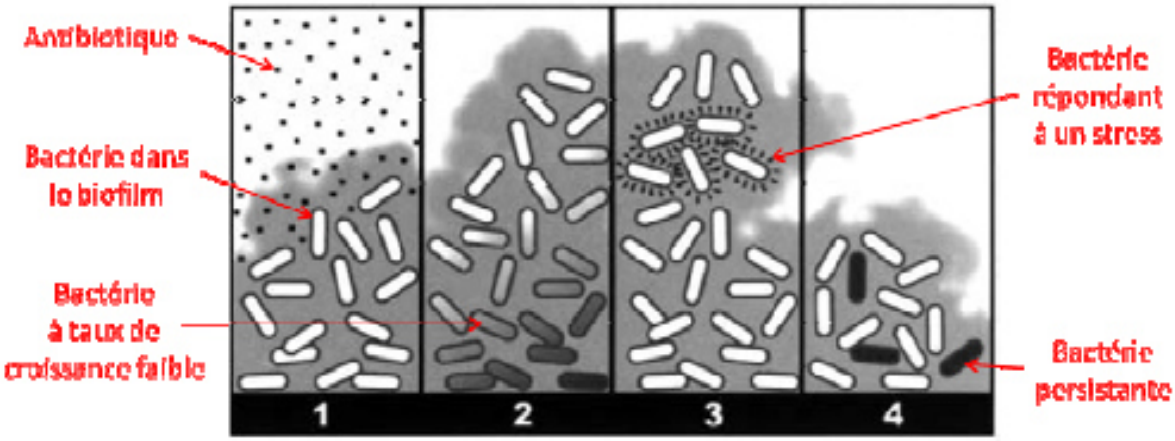

Figure 03 : Hypothèses de mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques.

1-Les anti-microbiens pénètrent peu et/ou lentement ;

2- Les bactéries en profondeur du biofilm ne se multiplient pas ou peu ;

3- Une réponse adaptative au stress est exprimée par certaines bactéries ;

4- Une petite partie des bactéries est persistante **(Stewart, 2002).**

2. Biofilms bactériens et risque infectieux : bactéries en cause, les virus aussi

Parmi les microorganismes capables de former des biofilms, on peut citer les bactéries, les champignons, les algues, les protozoaires et les virus. Les biofilms peuvent être constitués d'une seule espèce mais généralement on retrouve des biofilms mixtes dans la nature. Les principaux micro-organismes d'intérêt médical ont :

***-Pseudomonas aeruginosa* :**

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve dans le sol, l'eau ou la végétation. Cette bactérie est à l'origine d'infections opportunistes chez des patients le plus souvent immunodéprimés ou fragiles (sujets âgés, patients atteints de mucoviscidose, brûlés, …). Les infections les plus courantes sont les infections pulmonaires, du tractus urinaire, des plaies ou les bactériémies. Les infections chroniques se caractérisent par la formation d'un biofilm bactérien puisque cette bactérie a une grande capacité à coloniser les surfaces et à former des biofilms **(Bezoui, 2016).**

***-Staphylocoques* :**

Les staphylocoques sont responsables de la grande majorité des infections causées par des biofilms. *Staphylococcus epidermidis* et *staphylococcus aureus* sont les agents les plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales et d'infections sur les dispositifs médicaux, qui impliquent la formation de biofilm. *Staphylococcus epidermidis*, espèce dominante de la flore résidente de la peau, a été considérée pendant de longues années comme une bactérie non pathogène car l'émergence d'infections nosocomiales à *Staphylococcus epidermidis* sur des dispositifs médicaux a été récemment rapportée. Par comparaison avec *S. aureus*, cette espèce exprime moins de facteurs de virulence tels que la sécrétion de toxines ou la résistance au système immunitaire, mais sa capacité à former des biofims très mucoïdes lui permet de devenir un pathogène opportuniste **(Bezoui, 2016).**

-Escherichia coli

Escherichia coli est une bactérie commensale de l'intestin de l'homme et des animaux. C'est l'espèce aérobie la plus importante de la flore digestive. C'est aussi le premier germe responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Les infections à *Escherichia coli* sont de deux types : les infections intestinales et les infections extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies et méningites). Parmi les nombreux facteurs de virulence décrits chez *Escherichia coli*, un certain nombre sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation de biofilms. On peut citer les flagelles et les fimbriae (ou pili), plutôt impliqués dans les étapes d'adhérence aux surfaces et de développement précoce du biofilm, ainsi que l'antigène 43, le PGA (Poly-β-1,6-N-acétylglucosamine), la cellulose ou l'acide colanique qui ont un rôle dans la maturation du biofilm **(Bezoui, 2016).**

Origine fongique :

Au cours de cette dernière décennie. Au côté d'infections bactériennes, en remarque un nombre en constante augmentation d'infections systémiques d'origine fongique, principalement causées par les levures du genre Candida. Ces levures, plus particulièrement *Candida albicans*, *Candida glabrata, Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis*, sont considérées comme la troisième ou quatrième causeesd septicémies acquises à l'hôpital.

Candida albicans est l'espèce fongique la plus souvent associée à la formation des biofilms. Cette levure est capable de développer des biofilms sur presque tous les implants médicaux, les cathéters vasculaires et pacemakers les prothèses dentaires et lentilles de contact.

Dans 1 à 60% des infections hospitalière il y a développement d'une infection après l'introduction d'un dispositif médical et les espèces de Candida sont responsables d'environ 20% de ces infections. De plus, *Candida albicans* peut coloniser aussi différents tissus de l'hôte, comme par exemple l'endothélium des valves cardiaques ou la muqueuse vaginale, conduisant ainsi au développement des endocardites ou des vaginites **(Bezoui, 2016).**

Les données cliniques ainsi que les études menée surs des biofilms formés in vitro par différentes espèces de Candida montrent que ces biofilms, au même titre que ceux formés par les bactéries, présentent une résistance intrinsèque à la plupart des antifongiques utilisés en clinique, expliquant, par là même, l'impact de la colonisation des implants sur les candidémies.

Par ailleurs, il a été montré que les biofilms à Candida réduisent considérablement leur sensibilité aux différents antifongiques, ce qui rend leur traitement difficile à réaliser et présente un important problème de santé publique. Cette résistance est un phénomène multifactoriel car ces biofilms échappent à la réponse immunitaire de l'hôte et réduisent significativement la thérapie antifongique **(Bezoui, 2016).**

Origine virale :

En 2010, et pour la première fois des chercheurs de l'Institut Pasteur et du CNRS Centre national de la recherche scientifique à Pari s montrent que certains virus peuvent constituer des structures complexes similaires aux biofilms bactériens. Ces formations, qui assureraient une protection des virus face au système immunitaire, permettent une dissémination efficace de cellule à cellule.

Selon l'étude publiée, les biofilms viraux seraient le mode de propagation majeur de certains virus et pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques en infectiologie. Le modèle d'étude des chercheurs français est le rétrovirus HTLV-1.

Il s'agit d'agrégats de virus et de matrice extracellulaire riche en sucres, secrétée par la cellule, et dont la synthèse que code le génome du viral intégré au génome cellulaire.

Les scientifiques cherchent à présent à caractériser les mécanismes de production des biofilms viraux et à déterminer si d'autres types viraux forment de telles structures. Pour les

virus formant des biofilms, il serait intéressant de redessiner des stratégies thérapeutiques antivirales nouvelles, avec pour cibles le virus et le biofilm.

Tableaux02 : principales bactéries impliquées dans le développement des infections chroniques liées aux biofilms chez l'homme **(Fux et al, 2009).**

Infection or disease	Common bacterial species involved
Dental caries	Acidogenic Gram-positive cocci (*Streptococcus sp.*)
Periodontitis	Gram-negative anaerobic oral bacteria
Otitis media	Nontypeable *Haemophilus influenzae*
Chronic tonsillitis	Various species
Cystic fibrosis pneumonia	*Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia*
Endocarditis	Viridans group streptococci, staphylococci
Necrotizing fasciitis	Group A streptococci
Musculoskeletal infections	Gram-positive cocci
Osteomyelitis	Various species
Biliary tract infection	Enteric bacteria
Infectious kidney stones	Gram-negative rods
Bacterial prostatitis	*Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria
Infections associated with foreign body material	
Contact lens	*P. aeruginosa*, Gram-positive cocci
Sutures	Staphylococci
Ventilation-associated pneumonia	Gram-negative rods
Mechanical heart valves	Staphylococci
Vascular grafts	Gram-positive cocci
Arteriovenous shunts	Staphylococci
Endovascular catheter infections	Staphylococci
Peritoneal dialysis (CAPD) peritonitis	Various species
Urinary catheter infections	*E. coli*, Gram-negative rods
IUDs	*Actinomyces israelii* and others
Penile prostheses	Staphylococci
Orthopedic prosthesis	Staphylococci

3. Biofilm et infections sur matériel

L'OMS estime que 60 % des infections liées aux soins sont associées à l'implantation d'un dispositif médical ou chirurgical **(Auger, 2012).**

Tout dispositif peut devenir le site d'une éventuelle infection : les sondes urinaires, les cathéters veineux centraux, les sondes endotrachéales, les valves cardiaques artificielles, les prothèses orthopédiques. La physiopathologie de ces infections est généralement liée à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers. Immédiatement après son insertion, le dispositif entre en contact avec divers fluides biologiques tels que le sang, l'urine ou les sécrétions oropharyngées en fonction de sa localisation. Des protéines présentes dans ces

liquides biologiques (albumine, fibronectine, fibrinogène, ...) vont s'adsorber très rapidement sur la surface du dispositif et entraîner la formation d'un film muqueux : on parle de film de conditionnement. Ce film muqueux va favoriser l'attachement initial des bactéries et donc le développement de biofilm. Ce phénomène est notamment essentiel pour les bactéries qui n'ont pas de mécanismes d'adhérence particuliers **(Auger, 2012).**

Les micro-organismes responsables d'infections proviennent généralement de la flore cutanée, oropharyngée, gastro-intestinale ou génito-urinaire du patient, de l'environnement ou de la flore exogène véhiculée par le personnel hospitalier. Concernant spécifiquement *E. coli*, les infections urinaires sur sonde dominent largement le tableau des infections liées à la production de biofilm.

3.1. Les biofilms associés aux orthopédiques

Un dispositif de remplacement osseux implanté peut endommager les tissus environnants, créant ainsi des conditions favorables à la formation de biofilms microbiens et donc à des infections, en particulier lorsque le système immunitaire de l'hôte est compromis**.** Les infections associées aux implants orthopédiques sont nombreuses, avec des taux de morbidité et de mortalité plus élevés, et entraînent des complications dévastatrices, tandis que le traitement est coûteux. La possibilité d'infection de l'implant osseux augmente de 5 à 40 % en cas de nouvelle intervention chirurgicale. En général, environ 5 % des implants orthopédiques sont infectés **(Stoica et al, 2017).**

Les organismes responsables des infections associées aux implants orthopédiques sont souvent des infections opportunistes, et 16 % de ces infections sont polymicrobiennes. *S. epidermidis* et *S. aureus* sont les principaux agents étiologiques des infections orthopédiques, suivis de *Staphylococcus hominis, Staphylococcus haemolyticus, Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* **(Stoica et al, 2017).**

Du moment où elles surviennent après l'implantation : (1) les infections précoces qui surviennent Les infections associées aux implants orthopédiques peuvent être classées en fonction 3 mois après l'opération, produites par des micro-organismes à virulence élevée (par exemple, *S. aureus*) ; (2) les infections tardives qui surviennent entre 3 et 24 mois après l'opération, causées par des micro-organismes à virulence réduite (par exemple, staphylocoques à coagulase négative, *Propionibacterium acnes*) ; (3) les infections secondaires qui surviennent 24

mois après la chirurgie et qui sont des complications d'infections adjacentes (respiratoires, dentaires, cutanées et urinaires **(Stoica et al, 2017).**

Les infections associées aux prothèses de hanche requièrent une plus grande attention en raison des complications graves qui peuvent survenir. Le recours aux prothèses de hanche s'est accru au cours de la dernière décennie en raison de la nécessité d'améliorer la qualité de vie. Cependant, l'implantation est également associée à des effets indésirables causés par l'adhérence microbienne à la surface de la prothèse. Les micro-organismes peuvent provenir soit d'une contamination directe de la prothèse, soit d'une plaie contaminée, soit d'infections adjacentes. Le taux d'infection est de 1,5-2,5% du nombre total d'interventions, et la mortalité de 2,5%. Les patients d'âge avancé, présentant d'autres maladies (cardiopathie, diabète, cancer, arthrite rhumatoïde) ont un risque accru de contracter des infections associées à l'implantation d'une prothèse de hanche. Une incidence de 9,5 % d'infections a été rapportée chez les patients de plus de 80 ans. Les infections sont difficiles à traiter, nécessitant parfois le retrait de la prothèse, et sont donc responsables de l'échec de l'implantation.

Les staphylocoques sont les micro-organismes les plus fréquemment rencontrés dans les infections associées aux prothèses de hanche **(Stoica et al, 2017).**

3.2 Les biofilms associées aux cathéters

Parmi les infections associées aux DM, les infections associées aux cathéters sont les plus fréquentes en raison de leur utilisation accrue dans le cadre de la thérapie ou du diagnostic. Environ 25 % des patients hospitalisés ont besoin à un moment ou à un autre d'un cathéter urologique et, par conséquent, les infections urinaires associées aux cathéters.

Les infections associées aux cathéters sont les plus fréquentes des infections associées aux cathéters**.** La présence d'un cathéter urinaire et la durée d'utilisation in situ sont des facteurs qui peuvent favoriser la croissance de biofilms microbiens**.** Il a été estimé que le risque de contracter une infection augmente de 5 % par jour pour un cathéter in situ, de sorte que le risque pour un patient de développer une infection associée au cathétérisme est de 35 à 39 % **.** Les infections urinaires associées aux cathéters entraînent une augmentation de la morbidité, de la mortalité et de la durée d'hospitalisation **(Stoica et al, 2017).**

Les données recueillies dans 97 hôpitaux du Royaume-Uni au cours de la période 1997-2002 ont montré que les infections urinaires associées aux cathéters sont la principale source d'infections systémiques dans 8,5 % des cas. Des études réalisées en Irlande en 2004-05 concernant le contrôle des infections nosocomiales ont montré que 3,8% des cas de bactériémies étaient à l'origine des infections urinaires associées aux cathéters**.** En 2006, les hôpitaux ont fourni des données épidémiologiques sur la prévalence des infections nosocomiales en République d'Irlande, qui ont estimé que les infections urinaires nosocomiales sont les plus fréquentes (22,5 %), dont 56,2 % sont associées aux cathéters**.** Une étude épidémiologique menée en 2009, dans des centres de soins de longue durée, qui a inclus 14 672 patients de 13 pays européens a montré que les infections urinaires représentent 30% des cas d'infections nosocomiales. Les agents étiologiques des infections urinaires associées aux cathéters peuvent provenir du microbiote périnéal des patients ou des mains du personnel médical, et sont représentés par *E.coli* et les espèces des genres *Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter* et *Candida* **(Stoica et al, 2017).**

Les cathéters veineux centraux (CVC) utilisés en soins intensifs sont fréquemment impliqués dans des infections nosocomiales, qui touchent 250 000 patients aux États-Unis avec un indice de moralité de 35 %. Dans 74 unités de soins intensifs pédiatriques des États-Unis, il a été signalé que 1,3 à 11,9 % des patients présentaient une bactériémie associée aux cathéters veineux centraux. Les CVC peuvent être placés soit à court terme, jusqu'à 6 semaines, soit pour une période de 6 à 12 semaines en cas de CVC intermédiaire (par exemple, CVC pour hémodialyse, type Sheldon). Le CVC peut également être placé en sous-cutané à long terme (par exemple, les cathéters de type Hickman-Broviac utilisés pour l'administration de médicaments anticancéreux chez les patients atteints de tumeurs malignes, et pour la nutrition parentérale des patients atteints du syndrome de l'intestin court). D'autres types de cathéters impliqués dans les infections nosocomiales sont les cathéters Tenckhof utilisés pour la dialyse péritonéale, les cathéters veineux périphériques (associés aux phlébites), etc. **(Stoica et al, 2017).**

Les micro-organismes fréquemment isolés dans les infections liées aux CVC sont principalement représentés par les staphylocoques à coagulase négative (*S. epidermidis*) et *S. aureus*, suivis par les entérocoques, *Candida* sp., *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* **(Stoica et al, 2017).**

3.3. Les biofilms associées aux implants cardiovasculaires

Les infections associées aux prothèses valvulaires cardiaques sont peu fréquentes mais considérablement dangereuse, avec des taux de mortalité élevés parmi les patients, atteignant 30 %**.** Les micro-organismes peuvent se joindre et développer des biofilms à la surface des valves cardiaques, ce qui induit ce qu'on appelle l'endocardite des valves prothétiques. Les micro-organismes responsables de cette entité clinique sont *S. epidermidis, S. aureus, Streptococcus* spp, les bacilles Gram-négatifs, les entérocoques et *Candida* sp **(Stoica et al, 2017).**

Les greffes vasculaires sont des implants susceptibles d'entraîner des complications liées à des infections (qui peuvent résulter de biofilms microbiens développés à leur surface). Les greffes artério-veineuses, aortiques et fémoro-poplitées sont les principaux types de greffes vasculaires. Environ 4 à 5 % des greffons fémoro-poplités et, respectivement, des greffons artério-veineux implantés s'infectent. Les infections associées aux allogreffes aortiques sont rares, avec un taux d'infection de 2%, mais 90% de ces types d'infections sont fatales**.** Les greffes artérielles infra-inguinales sont associées à un taux accru d'amputation. Le taux d'amputation semble se stabiliser à 1-5%, en cas d'utilisation des meilleures techniques chirurgicales et d'une prophylaxie antibiotique, mais cette thérapie est devenue difficile en raison des organismes résistants aux médicaments (par exemple, 30% des isolats cliniques de *S. aureus* sont des SARM**) (Stoica et al, 2017).**

3.4 Les biofilms associées aux implants ophtalmiques

Les lentilles de contact sont classées en deux catégories : les lentilles souples (en silicone et en hydrogel) et les lentilles dures (en polyméthylméthacrylate). *P. aeruginosa* et les espèces staphylococciques représentent un risque majeur d'infection cornéenne chez les porteurs de lentilles. Lorsque les micro-organismes entrent en contact avec les lentilles, ils peuvent provoquer des ulcères, une affection connue sous le nom de kératite microbienne. *S. epidermidis* est une bactérie pathogène responsable d'infections associées à l'implantation chirurgicale de lentilles intraoculaires, provoquant une endophtalmie postopératoire aiguë **(Stoica et al, 2017).**

3.5 Les biofilms associée à la ventilation

La pneumonie sous ventilation assistée (PVA) est l'une des infections nosocomiales les plus fréquentes dans les unités de soins intensifs, avec une incidence de 9 à 70 %, qui commence après l'intubation trachéale et la ventilation pulmonaire artificielle du patient, pendant une

période d'au moins 48 heures. La PVA est associée à une morbidité accrue, à une hospitalisation et à une thérapie d'extension très coûteuse. La mortalité causée par la PVA est de 27 à 50 %, et elle est plus élevée dans les unités de soins intensifs pour les profils chirurgicaux. Environ 8 à 28 % des patients sous ventilation mécanique pendant plus de 48 heures vont développer une PVA. Ce phénomène est possible en raison de la colonisation de l'appareil respiratoire par des bactéries issues du microbiote Gram négatif oral ou intestinal. Le SARM, *P. aeruginosa, Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* sp. et *Serratia* sp. sont des micro-organismes que l'on retrouve dans les PAV à apparition tardive. La prévalence de la PVA est élevée chez les patients porteurs d'appareils d'assistance respiratoire (tubes endotrachéaux, trachéotomie) **(Stoica et al, 2017).**

4. Analyse des biofilms sur les matériaux

4.1. Extraction des biofilms

De nombreux auteurs ont cherché la méthode la meilleure pour décrocher les biomasses sans pour autant nuire à l'état physiologique des cellules. Les méthodes sont généralement basées sur des décrochages mécaniques (grattage) ou aux ultra-sons (cuves ou sondes) **(Virgine, 2008)** ont comparé trois techniques d'extraction des biofilms :

-agitation avec 4 ml d'eau pendant 15 secondes
-agitation avec des billes de verre stérile (0-3 g, 1-5 mm de diamètre) dans de l'eau (4 ml) pendant 15 secondes.
-grattage de la surface interne de la canalisation dans le sens de la longueur avecune spatule stérile suivi par agitation avec 4 ml d'eau pendant 15 secondes.

Les auteurs ont montré que l'agitation mécanique avec de l'eau stérile et des billes de verre était la méthode la plus efficace pour récupérer les bactéries contenues à l'intérieur des biofilms.

Les résultats sont toutefois très variables et dépendent de l'expérimentateur, du matériel utilisé et des essais inter-laboratoires ont été menés pour tenter de trouver une méthode standard qui n'a pas encore pu être normalisée **(Virgine, 2008).**

4.2. Les différentes techniques d'analyse

Le comptage direct *in situ* des bactéries dans les biofilms se fait en microscopie à épifluorescence grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents comme l'acridine orange, le DAPI ou le Bac Light. Les bactéries à activité respiratoire ou considérées comme mortes apparaissent colorées différemment donc faciles à distinguer et à dénombrer. Cette technique est limitée par une pénétration insuffisante des colorants dans les biofilms épais et par la variabilité dans l'aptitude des microorganismes à transporter et à réduire le marqueur fluorescent Une autre méthode consiste à décrocher les biomasses fixées et à les analyser au laboratoire. L'utilisation d'enzymes (glucosidases, lipases ou protéases) pour hydrolyser la matrice d'exopolymères permet aussi de libérer les microorganismes. L'évaluation des biomasses libérées se fait soit par culture sur gélose (milieu R2A incubé 7 jours à 22°C), soit par toutes les méthodes de dénombrement et de dosage utilisables telles que la mesure de l'adénosine triphosphate microbien (ATP) par réaction enzymatique en bioluminescence, la microscopie en épifluorescence confocal ou non soit par une méthode d'amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) ou des puces à ADN **(Virgine, 2008).**

Parmi ces différentes méthodes d'analyse, la culture en gélose a l'avantage de caractérise la cultivabilité des microorganismes. Toutefois, elle n'est pas représentative de la biodiversité Des communautés microbiennes présentes puisque seulement 0,01 à 30% des microorganismes des biofilms formés sur les matériaux au contact de l'eau potable sont cultivables.

Quant au dosage de l'ATP qui est rapide, sensible et semi-automatisé, il permet de mesurer exclusivement la biomasse au métabolisme actif mais ne donne aucune information sur les caractéristiques des microorganismes présents et sur leur caractère pathogène potentiel.

La méthode d'amplification de l'ADN est assez sensible avec une limite théorique de détection d'un microorganisme, relativement rapide et automatisable mais elle ne donne aucune information sur la viabilité ou la cultivabilité des cellules.

4.3. Méthodes expérimentales

Des méthodes expérimentales ont été développées ces dernières années afin de déterminer les propriétés de croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable. Il faut souligner que les études disponibles n'ont été réalisées que sur des matériaux neufs, et que

l'influence des paramètres liés au vieillissement des réseaux (notamment de facteurs tels que le tartre et la corrosion, dont l'influence sur le développement du biofilm et des organismes indésirables est incontestable) n'ont donc pas été pris en compte. Il est donc nécessaire de conduire des expérimentations complémentaires sur des matériaux anciens, qui permettront de garantir dans la durée la qualité de l'eau fournie par les réseaux **(Virgine, 2008).**

Ainsi aux Pays-Bas, utilisent le dosage de l'adénosine triphosphate (ATP) comme indicateur de biomasse active. L'ATP est utilisée comme indicateur de biomasse active. L'ATP est un composé riche en énergie, qui est présent dans les organismes vivants (en activité). L'analyse de l'ATP permet de détecter des concentrations très faibles de micro-organismes **(Virgine, 2008).**

Le test BPP (pouvoir de production de biomasse), développé par leur laboratoire (Kiwa), est un test statique sans remplacement de l'eau. Il consiste à incuber dans l'obscurité à 25 ± 1°C des échantillons de matériaux dans une eau potable biologiquement stable (taux de carbone organique assimilable très faible), à laquelle sont ajoutés des sels de potassium et des microorganismes isolés d'eau de rivière **(Virgine, 2008).**

Le pouvoir de production de biomasse (BPP) des matériaux est déterminé par la somme des concentrations de biomasse active formée sur le matériau (pouvoir de formation du biofilm - BFP) et des concentrations de biomasse en suspension dans l'eau (SBP), après 56, 84 et 112 jours d'exposition. La valeur de BPP, exprimée en picogrammes d'ATP par centimètre carré de surface du matériau testé (pg ATP/cm²) est la moyenne des valeurs Obtenues sur la période de 16 semaines du test. Une classification en classes de qualité a été proposée pour les matériaux selon leur pouvoir de formation du biofilm **(Virgine, 2008).**

4.4. Méthode européenne harmonisée

Le groupe de travail « Croissance microbienne » du projet de l'Union européenne Développement de tests harmonisés utilisés pour les matériaux au contact de l'eau potable » a développé une méthode d'étude harmonisée pour évaluer les propriétés de promotion de la croissance microbienne des matériaux au contact de l'eau potable **(juillet 2003).** Cette méthode est dérivée du test BPP (test BPP révisé) et repose sur l'ATP comme indicateur de biomasse **(Virgine, 2008).**

Pour ce faire, des échantillons représentatifs du matériau sont incubés à l'obscurité à 30 ± 2°C dans de l'eau potable renfermant des nutriments inorganiques définis et inoculée par un mélange de micro-organismes naturels d'une eau de rivière. L'eau est remplacée toutes les semaines. La biomasse produite sur la surface du matériau (biofilm) et dans l'eau est estimée par des mesures d'ATP après 8, 12 et 16 semaines d'incubation. La production de biomasse par unité de surface (pg d'ATP/cm²) est calculée à partir de la concentration de la biomasse fixée et de la biomasse en suspension dans l'eau. La validation des résultats est obtenue en incluant des témoins négatifs (verre) et des matériaux de référence en parallèle des matériaux testés. Le pouvoir de production de biomasse (BPP) est la concentration moyenne des valeurs de la production de biomasse observée sur la surface des matériaux et dans l'eau, mesurée par l'ATP, après 56, 84 et 112 jours d'incubation dans l'eau (en retranchant la valeur moyenne observée sur le verre, témoin négatif). La biomasse est détachée du matériau par un appareil à ultra-sons (40 KHz). La valeur de BPP est exprimée en pg d'ATP/cm² **(Virgine, 2008).**

Dès lors, la comparaison des méthodes avec un nombre limité de matériaux, a démontré clairement la complexité de l'évaluation de la production de biomasse sur la surface des matériaux au contact de l'eau potable et l'impact des conditions du test sur cette production.

Ainsi les études, à la fois statiques, sans remplacement de l'eau, et dynamiques, menées par le Kiwa, se rapprochent le plus de la méthode européenne harmonisée.

L'analyse d'ATP est aussi utilisée pour déterminer la concentration de biofilm sur les parois des canalisations et dans un appareil spécifique afin d'obtenir le taux de formation de biofilm (BFR) de l'eau potable **(Virgine, 2008)** .

Les biomasses microbiennes se développent à l'interface eau-canalisations et représentent une source de contamination, de dégradation de la qualité des eaux et de protection/prolifération d'organismes indésirables. Leur développement est lié aux facteurs physiques et chimiques des matériaux et de l'eau qui circule ainsi que les conditions hydrauliques.

Les méthodes fiables de mesure et de prédiction des proliférations de biofilms sont du domaine expérimental, très dépendantes de chaque laboratoire et ne sont pas encore normalisées et validées au niveau international **(Virgine, 2008).**

Il importe donc d'être prudent face aux résultats publiés en les examinant avec attention et objectivité en fonction du protocole opératoire employé.

5. Prévention et traitement des infections liées aux biofilms

Le biofilm pose de graves problèmes de Santé publique. La lutte contre le biofilm se définit selon deux axes principaux : empêcher sa formation puis, lorsqu'il est présent, l'éliminer.

5.1. Moyens de lutte contre la formation des biofilms

Quelques principes fondamentaux sont indispensables à la prévention des infections sur matériel liées aux biofilms. Il faut limiter l'utilisation de ces dispositifs médicaux au strict nécessaire, les garder en place le moins longtemps possible, les poser dans des conditions strictes d'hygiène, ... Cependant ces règles ne sont pas suffisantes et de nombreuses recherches sont consacrées à la lutte contre la formation des biofilms. Les idées principales sont les suivantes :

5.1.1. Les dispositifs imprégnés de substance hydrophile

L'adhérence bactérienne dépend fortement des propriétés physicochimiques des matériaux constituants les dispositifs médicaux implantés, notamment leur hydrophobicité et les charges présentes à leur surface. Les dispositifs médicaux constitués de polymères hydrophiles à leur surface permettent de limiter l'adhérence des bactéries **(Auger, 2012)**.

5.1.2. Les dispositifs imprégnés d'argent ou de substances antimicrobiennes

L'argent limiterait l'attachement et la croissance des bactéries**.** Des analyses ont montré que ces systèmes seraient efficaces pour prévenir les bactériuries lors des sondages de courte durée. **(Auger, 2012)**.

Le nitrofurane aurait les mêmes propriétés**.** L'argent a également montré son efficacité dans la prévention de la formation de biofilm pour les dispositifs intravasculaires mis en place moins de 10 jours **(Auger, 2012)**.

Des sondes urinaires recouvertes d'antiseptique ont également été testées : la formation de biofilm serait moins importante sur des sondes urinaires recouvertes de Gendine, un antiseptique constitué de violet de gentiane et de chlorhexidine, que sur des sondes urinaires en hydrogel

imprégnées d'argent et sur des sondes urinaires non recouvertes d'agent antimicrobien **(Auger, 2012)**.

Les cathéters intravasculaires imprégnés de chlorhexidine et d'argent mis en place pendant moins de 14 jours ont montré une réduction du risque d'infection d'environ 40 %, mais des cas de réaction anaphylactique ont été retrouvés avec ce type de cathéter **(Auger, 2012)**.

5.1.3 Les agents chélateurs

Certains cations métalliques comme le calcium, le magnésium ou le fer peuvent être impliqués dans le développement et le maintien de la structure de la matrice du biofilm. Les agents chélateurs déstabiliseraient la structure du biofilm. De plus, certains agents chélateurs comme l'EDTA (Ethylène DiamineTétraacétique Acide) ou le citrate de sodium possèdent également une activité antimicrobienne **(Donlan,2011).** Des études ont été menées avec la lactoferrine, un agent chélateur du fer, dans le cadre des infections urinaires sur sonde mais de tels dispositifs n'ont pas encore été développés.

5.1.4. L'éthanol

Pour les cathéters intravasculaires, l'utilisation de « verrou antimicrobien » à base d'éthanol permettrait de limiter les infections liées à ces cathéters**.** La combinaison de 4 % de citrate de sodium et de 30 % d'éthanol préviendrait la formation de biofilm par des souches cliniques *d'E. coli* pendant 72 heures **(Donlan, 2011).**

5.2. Techniques d'élimination du biofilm

Une fois le biofilm formé, il est très difficile de l'éliminer. Dans le cadre des infections associées à un dispositif invasif, la réussite du traitement est très souvent conditionnée par l'ablation du dispositif.

Cependant, l'antibiothérapie à long terme est nécessaire lorsque le dispositif ne peut être retiré. Des alternatives sont en cours de recherche.

5.2.1. L'antibiothérapie

Les biofilms sont caractérisés par une résistance aux antibiotiques élevée. Les antibiotiques sont surtout efficaces pour ralentir la progression de la formation de biofilm en éliminant les bactéries planctoniques libérées et en limitant l'activité métabolique des bactéries en surface. Les molécules qui pénètrent bien dans le biofilm telles que les fluoroquinolones et la rifampicine sont plus efficaces. Une étude a également montré que l'association amoxicilline-acide clavulanique pénètre bien dans le biofilm (50 % de la concentration initiale après 1 heure d'incubation, 60 à 70 % après 6 heures), de même que la fosfomycine et la ciprofloxacine mais plus lentement. Le cotrimoxazole a en revanche une pénétration beaucoup plus réduite **(Auger, 2012)**.

D'autre part, les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne, comme les glycopeptides, sont peu efficaces sur l'élimination des biofilms car de nombreuses bactéries ont un taux de croissance ralentie. Les macrolides ont montré leur efficacité dans la réduction des exopolysaccharides du biofilm : ils favorisent alors la pénétration des autres antibiotiques**.** De nouvelles molécules comme le ceftobiprole, une céphalosporine de 4ème génération, sont à l'étude. Cependant, l'antibiothérapie reste trop peu souvent efficace et ne doit pas remplacer le retrait du dispositif lorsque cela est possible **(Auger, 2012)**.

5.2.2. Cibler la matrice exopolysaccharidique

La matrice exopolysaccharidique est essentielle pour la survie du biofilm. Les substances capables de dépolymériser, dissoudre ou d'empêcher la synthèse de cette matrice vont permettre l'exposition des micro-organismes du biofilm aux agents antimicrobiens. En règle générale, la matrice est composée de polysaccharides et de protéines associés à des lipides et des acides nucléiques, mais cette composition est variable, qualitativement et quantitativement, en fonction des souches et des conditions de croissance. Par exemple, la cellulose est un composant crucial dans la matrice extracellulaire de *E.coli,* et le poly-N-acétylglucosamine est le composant majoritaire des biofilms à *staphyloques.* En fonction de la composition des biofilms, différentes enzymes sont utilisables comme les protéases, cellulases, polysaccharide dépolymérases, alginate lyases, dispersin B ou DNAse**.** Les biofilms étant souvent constitués de plusieurs espèces, des formulations contenant plusieurs enzymes semblent fondamentales pour une stratégie de contrôle efficace**.** Certains bactériophages peuvent aussi produire des enzymes comme le polysaccharide dépolymérase qui peuvent dégrader la matrice des biofilms **(Auger, 2012)**.

5.2.3. Cibler les bactéries persistantes

Le développement de substances capables de détruire la population bactérienne persistante en profondeur du biofilm pourrait être une nouvelle approche thérapeutique. Les gènes responsables de ce phénotype persistant pourraient également servir de cible. Ces inhibiteurs de bactéries persistantes seraient combinés à un traitement antimicrobien conventionnel pour tenter d'éradiquer les biofilms **(Auger, 2012)**.

5.2.4. Inhiber le quorum sensing

Pour de nombreuses espèces, le quorum sensing joue un rôle significatif dans la persistance du biofilm. L'utilisation de molécules interférant avec les voies de signalisation du quorum sensing perturberait l'architecture du biofilm et ainsi l'établissement du processus infectieux.

Les furanones sont des inhibiteurs potentiels du quorum sensing chez les bacilles à Gram négatifs**.** Une étude a testé l'effet d'inhibiteurs du quorum sensing sur des biofilms à *P. aeruginosa* et S. aureus formés in vivo et in vitro. Associé à un traitement antibiotique, ces inhibiteurs pourraient améliorer la sensibilité des bactéries au sein des biofilms à cet antibiotique **(Auger, 2012)**.

Chapitre III : Biofilms dans L'industrie

1. Contexte général

L'étude des biofilms dans le milieu des industries alimentaires relève, pour une grande part, du domaine de la sécurité sanitaire des aliments. Presque toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remises en cause par le problème des biofilms. Ces derniers causent à l'industrie alimentaire des pertes annuelles de plusieurs millions de dollar **.**Leur formation sur les surfaces en contact avec les aliments est quasi inévitable et est favorisée par les condition qui prévalent dans les établissements de transformation des aliments. Les biofilms des industries alimentaires sont à l'origine de problèmes qui affectent la qualité hygiénique et sanitaire des produits transformés ainsi que celle des matériaux. En effet, les biofilms sont incriminés dans 40% des toxi-infections alimentaires en France, et sont considérés comme un risque pour la santé même s'ils ne contiennent que des bactéries inoffensives parce qu'ils constituent un refuge pour les pathogènes**.** Les bactéries du biofilm se détachent, et peuvent se retrouver dans le produit fini et affecter ainsi sa qualité hygiénique et sanitaire. Le développement de biofilm peut aussi induire la corrosion des surfaces métalliques alimentaires et réduire l'efficacité des appareils par diminution de transfert de chaleur dans les échangeurs thermiques **(Malek, 2013).**

Les nombreuses revues anciennes et nouvelles sur le sujet traitent des biofilms avec pour objectif principal la maitrise des contaminations microbiennes induites, et par conséquent la mise en œuvre des moyens pour les éliminer. Le problème de la résistance des biofilms aux procédures de nettoyage /désinfection est souligné**,** leur élimination requiert des traitements sévères avec de puissants oxydants**.** Un autre élément de complexité du problème est la découverte de l'existence de liens génétiques entre la résistance aux désinfectants et aux antibiotiques**.** De nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms sont ainsi nécessaires. L'approche préventive est prometteuse, de nombreux travaux explorent cette voie, cherchant à mettre au point les moyens et procédés pour empêcher la formation de biofilms. Toutefois, la recherche dans ce domaine est encore au stade de l'expérimentation dans la majorité des cas. **(Malek, 2013).**

2. Le modèle du biofilm industriel

Les biofilm dans l'industrie alimentaire constituent des modèles particuliers qui ne correspondent pas complètement aux modèles de biofilms établis sur la base des observations faites dans les écosystèmes naturels. Ceux-ci sont reconnus se former en réponse aux stress environnementaux qui sévissent généralement dans les milieux naturels, notamment le déficit nutritionnel. Les principes à la base de ces biofilms ne peuvent donc pas être appliqués aux systèmes des industries alimentaires caractérisées par la richesse en nutriments. D'autant plus que l'impact des conditions des processus technologiques de transformation des aliments sur le développement des biofilms doit également être pris en considération. Dans certains modèles développés pour les systèmes de transformation des aliments **(Malek, 2013).** L'étape constituée par les traitements de nettoyage /désinfection est incluse dans le cycle de formation du biofilm **(voir la figure 04)**

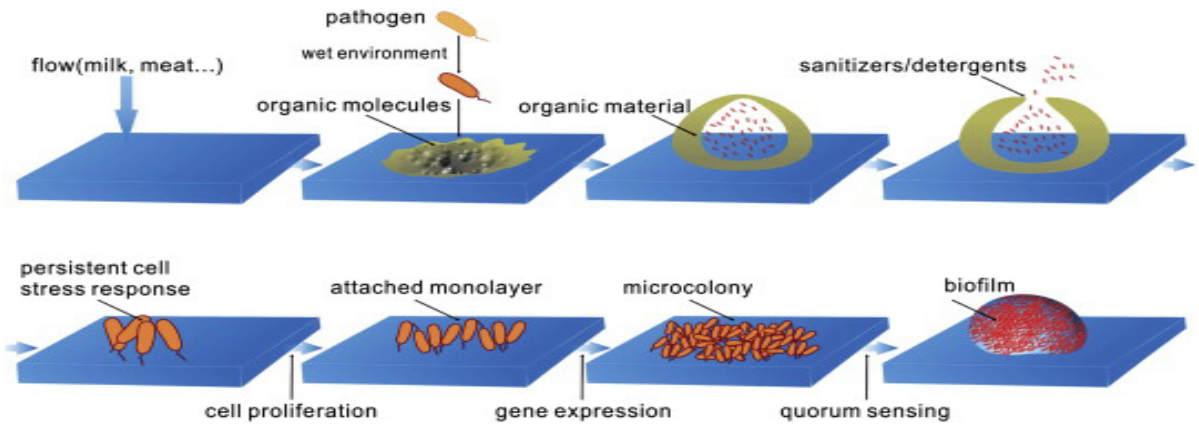

Figure04 : Séquences des événements dans la formation des biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments **(Shi et Zhu, 2009).**

Les molécules organiques se déposent en premier sur la surface de l'équipement formant le film de conditionnement. En second lieu, des microorganismes biologiquement actifs sont attirés par les molécules organiques. Troisièmement, des cellules microbiennes persistantes restent après le nettoyage/désinfection et initier une croissance. En dernier, le biofilm se forme avec l'expression des gènes cellulaire et quorum-sensing. En outre, des biofilms comme ceux qui se forment dans les conduites de lait peuvent se propager à un taux qui leur est propre par division cellulaire, mais il peuvent aussi périodiquement libérer des cellules pionnières capables

de coloniser les sections en aval du système de pipe. Comme décrit pour le système clinique**,**dans les milieux riches en nutriments, le biofilm se forme préférentiellement dans les conditions de forte turbulence**.** Dans ces systèmes, il est généralement admis que les propriétés dynamiques du milieu à savoir la vitesse d'écoulement. Les flux turbulents favorisent l'adhésion en propulsant les bactéries libres sur les surfaces**.** De ce fait, les principes issus de l'étude des biofilms dans les systèmes naturels ne peuvent être appliqués aux environnements industriels. **(Malek, 2013).**

3. Le biofilm en industrie laitière

Un important réservoir de contaminations microbiennes qui a reçu relativement peu d'attention en industrie laitière est le biofilm microbien. La formation de biofilms peut avoir lieu dans les différents sites de la chaine de transformation du lait. Les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement tels que les pasteurisateurs et des évaporateurs, sont reconnus pour être une source de contamination du lait traité par des germes d'altérations ainsi que des pathogènes. Le développement des biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12h), avec des nombre de bactéries souvent supérieurs à 106 bactéries/cm2. Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les actoducs est grand, ce qui implique la contamination microbienne des produits laitiers transformés et la diminution de leur sécurité et durée de vie **(Malek, 2013).**

En raison de leur résistance au traitement thermique et aux agents antimicrobiens, les biofilms de l'environnement laitier sont difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfection acceptable. En outre il a été montré**,** que la ré-adhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait survient même durant le nettoyage en place (CIP :cleaning -in –place).Dans ce domaine-là, l'émergence de la résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens conventionnels est également soulignée **(Malek, 2013).**

4. Les facteurs influençant l'attachement aux surfaces industrielles

Parmi les facteurs qui influencent l'attachement microbien aux surfaces inertes. Les propriétés de surface des cellules et des supports inertes sont largement citées dans la littérature **(Malek, 2013).**

5. L'hydrophobicité et la topographie du support

Les matériaux les plus couramment utilisés en industrie laitière sont les aciers inoxydables AISI 304 et 316 L, parce qu'ils répondent exactement aux en contact avec les aliments.Ce sont des matériaux qui sont neutres sur les plan chimique, bactériologique et organoleptique, ils sont faciles à nettoyer et résistants à la corrosion**.** Les polymères et les caoutchoucs sont également utilisés**.** Le choix du matériau est d'une grand importance, les propriétés de surface telles que la rugosité, la capacité de nettoyage et de désinfection, et l'humidité exprimée en hydrophobicité, déterminent le statu hygiénique du matériau et son influence sur l'adhésion bactérienne **(Malek, 2013).**

Parmi les caractéristiques de surface du support, l'hydrophobicité et les propriétés topographiques ou rugosité sont au centre d'une large controverse. La relation de ces deux paramètres à l'adhésion aux différents matériaux des surfaces industrielles varie largement entre les travaux**.** L'hydrophobicité est reconnue comme un paramètre significatif de l'adhésion des bactéries aux surfaces inertes. De nombreux travaux l'ont montré. Ont trouvé que l'adhésion de souches de *S.epidemidis* était plus forte aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces hydrophiles. L'augmentation de l'hydrophobicité du téflon et de l'acier inoxydable a in duit l'augmentation l'adhésion des spores de *B.cereus.* Dans d'autres études, l'adhésion de différentes bactéries à la surface de différents matériaux hydrophobes et hydrophiles (polystyrène, verre) n'était pas influencée par le type de matériel. Il est cependant admis que les cellules dont la surface est hydrophobe adhérent préférentiellement aux surfaces hydrophobes qu'aux surfaces hydrophiles et inversement. Toutefois, ceci ne semble pas être une règle générale sachant que la formation de biofilms hydrophiles sur des substrats hydrophobes a été rapportée. D'après d'autres facteurs tels que la production de polysaccharides doivent être pris en considération. En effet, il a été montré que chez des souches de *Proteus vulgaris* caractérisées par un caractère hydrophobe faible, la production de polysaccharides de faible poids moléculaire a permis de promouvoir l'adhésion de cette bactérie à l'acier inoxydable. Il a été également montré que des substances chimiques tels que les surfactants pouvait augmenter l'hydrophobicité de l »inox et promouvoir l'adhésion bactérienne. De même, l'usage répété et les traitements d'abrasion transforment le caractère hydrophile de l'inox en hydrophobe **(Malek, 2013).**

La rugosité du support est elle aussi largement controversée quant à sa relation à l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm .Cette propriété est d'écrite par des paramètres mathématiques dont les plus utilisés sont la rugosité arithmétique(Ra) et la rugosité quadratique

moyenne (RMS ou Rq).En effet, la surface de l'acier inoxydable n'est pas uniforme mais présente des dissymétries révélées dans l'ultrastructure de ce matériau et exprimées sous le terme de rugosité **(figure 05et 06).**Celle-ci peut influencer le mode d'agrégation des cellules et la formation de microcolonie et par conséquent la morphologie et la structure du biofilm **(Malek, 2013).**

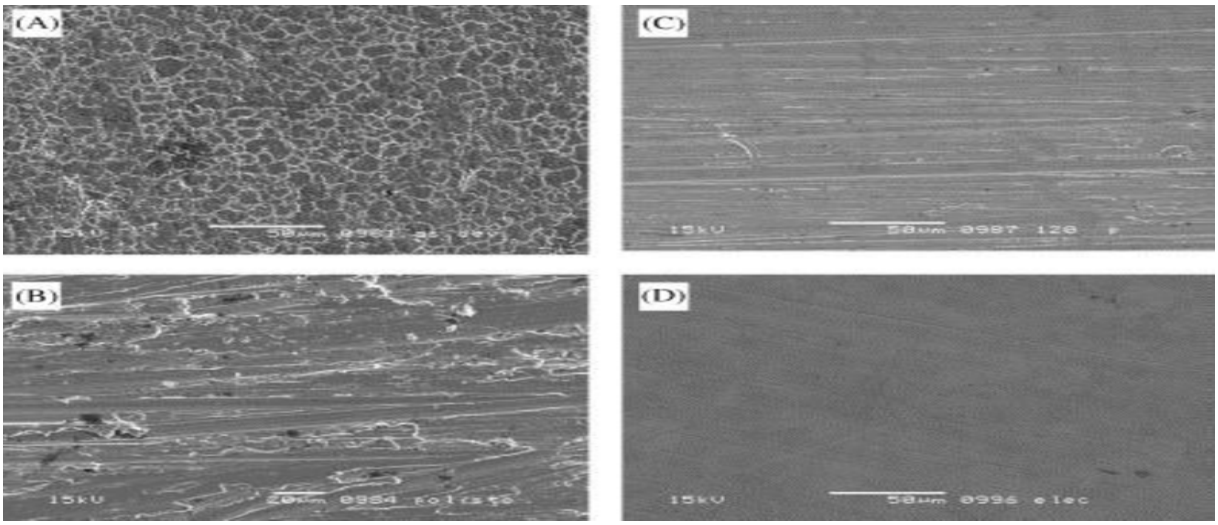

Figure 05: Micrographe en MEB de surfaces en inox avec différents finis de surface. A :sans traitement de polissage, B :polissage 80 grit, C :polissage 120 grit, D :électropolissage **(Hilbert et al .,2003).**

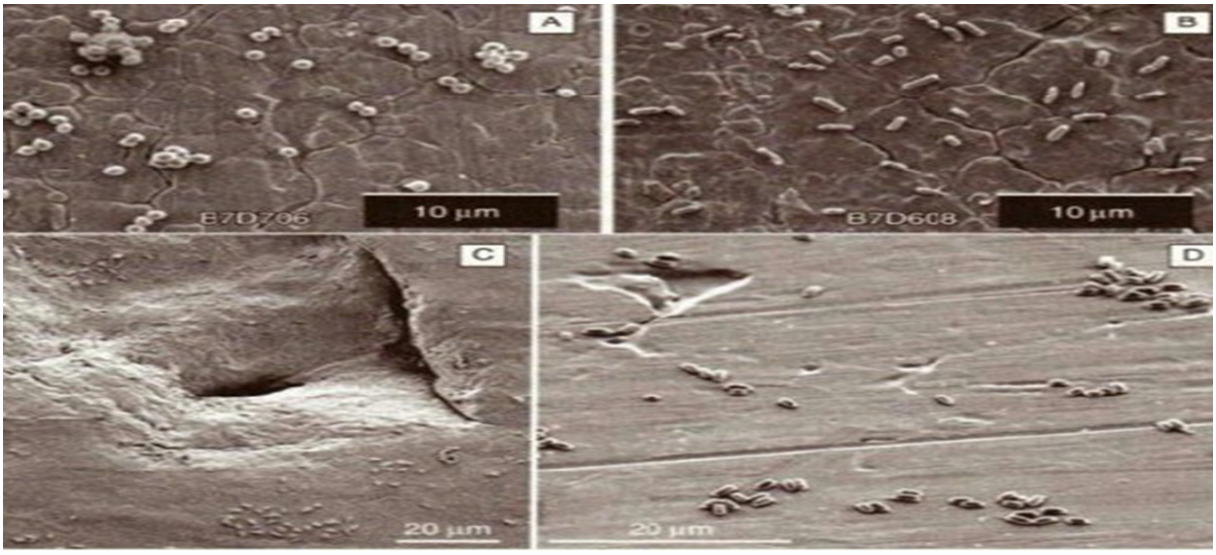

Figure 06: Adhésion de différents microorganismes sur des surfaces en acier inoxydable. (A-B) : adhésion par de Staphylococcus caprea et *Pseudomonas fluorescens* à l'inox avec un fini de surface 2B, (C-D) : adhésion des spores de B.cereus sur des supports avec des topographie irrégulières **(scratches,flaw..voir article).(Adapté de Faille et Carpentier,2009)** par **(Marchand et al,2012).**Les cellules peuvent adhérer de maniére isolées ou par groupe.

La rugosité est déterminée par la MEB et la microscopie de force atomique(AFM) ainsi que par mesure au rugosimètre .Une surface avec une valeur Ra égale à 0.8 µm est considérée comme une surface hygiénique en industrie alimentaire**.** Cette propriété est également influencée par l'usage, et peut servir, selon d'indicateur de la durée de vie équipements dans les établissements de transformation des aliments. En effet, les valeurs de rugosité(Ra) de convoyeurs neufs et de étaient égales à 0.05 et 1.44µm respectivement. Les surfaces lisses sont généralement considérées comme défavorables à l'adhésion bactérienne contrairement aux surfaces rugueuses. D'après **Donlan, (2002),** celles-ci sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'irrégularités. **(Malek, 2013).**

En outre, il a été montré que l'adhésion bactérienne est influencée par l'orientation des cellules, leur taille et l'écart entre les sillons**.** D'une part, l'orientation des cellules dans des directions autres que parallèles aux sillons de la surface du matériau réduit l'adhésion. La réorientation des spores de *B.cereus* a été montré expérimentalement sous l'effet de la force du flux **(Malek, 2013).**D'autre part, le maximum d'adhésion est obtenu quand la valeur moyenne de Ra est proche de la longueur moyenne des bactéries **(figure 07).**

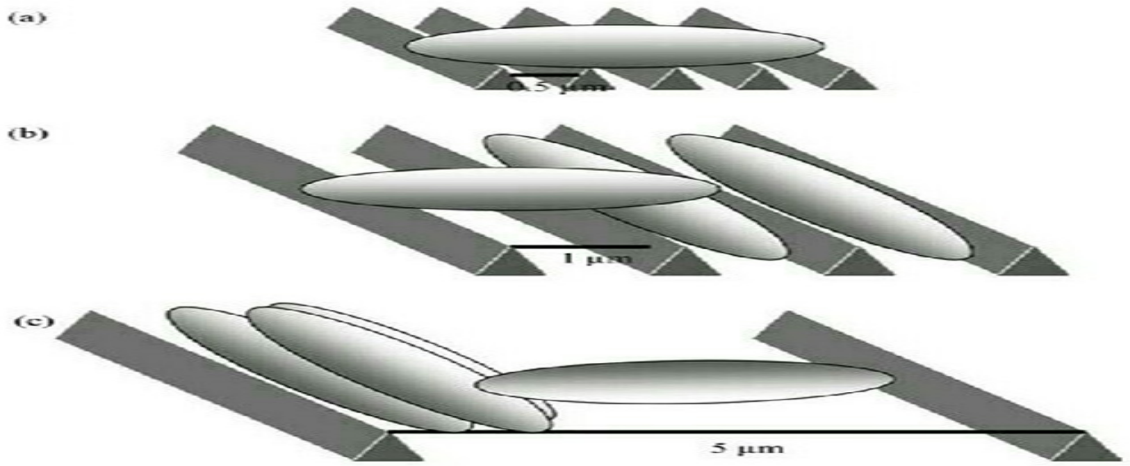

Figure 07: Influence des caractéristiques de surface et de l'orientation des bactéries sur le nombre de cellules retenues.(a)quand l'écart entre les sillons est faible (inférieur à la taille des cellules),la surface de contact cellule-c substratum est faible,(b) quand cet écart est supérieur à la taille des cellules, la surface de contact est plus grande,(c) pour des écarts plus importants, la surface de contact cellule-substrat étant plus faible, les cellules peuvent être éliminées des structures de surface.**(Whitehead et Verran,2006).**

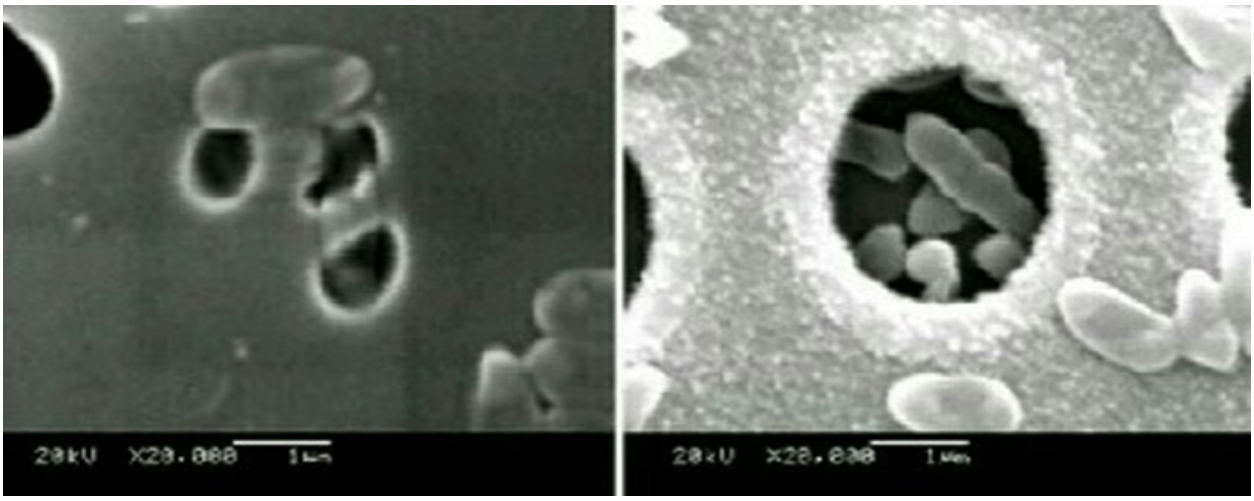

Figure 08: Des essais de rétention de bâtonnet sur des surfaces en oxide de titanium avec Des caractéristiques topographiques de (a)0.5µm et(b)2µm **(Whitehead et Verran, 2006).** Les cellules sont retenues dans les structures topographiques de même ordre de grandeur que les dimensions microbiennes.

Cette relation entre la taille des cellules et leur orientation d'une part et les caractéristiques topographiques du support d'autre part, pourrait expliquer les différences dans les résultats des travaux. En effet l'absence de relation entre l'adhésion des bactéries et la rugosité est rapportée. Dans une étude ont montré que des surfaces ayant subi un électro polissage poussé ont permis l'adhésion d'un nombre important de bactéries**,** ont également trouvé que la rugosité de l'acier inoxydable(Ra variant de 0.01 à0.9µm)n'influait ni sur l'adhésion ni sur la colonisation des surfaces ni sur l'élimination des biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sa mais qu'elle était un paramètre important dans la résistance à la corrosion(exercée par un agent de désinfection).Dans une autre étude, ont montré que la rugosité de surface n'affecte pas l'adhésion de *S.aureus* et *E.coli* à différent substrats. La rugosité seule ou associée à l'hydrophobicité a été trouvée liée à la capacité de nettoyage des surfaces plutôt qu'à l'aptitude à l'adhésion des microorganismes. Les surface lisses sont plus facilement nettoyées que les surfaces rugueuses et montrent également une plus grande résistance à la corrosion. Certain traitements permettent d'améliorer l'aptitude de l'inox au nettoyage. Ainsi, ont montré que des surfaces couvertes de Titanium ont augmenté la nettoyabilité de l'acier inoxydable et diminué l'adhésion bactérienne **(figure09) (Malek, 2013).**

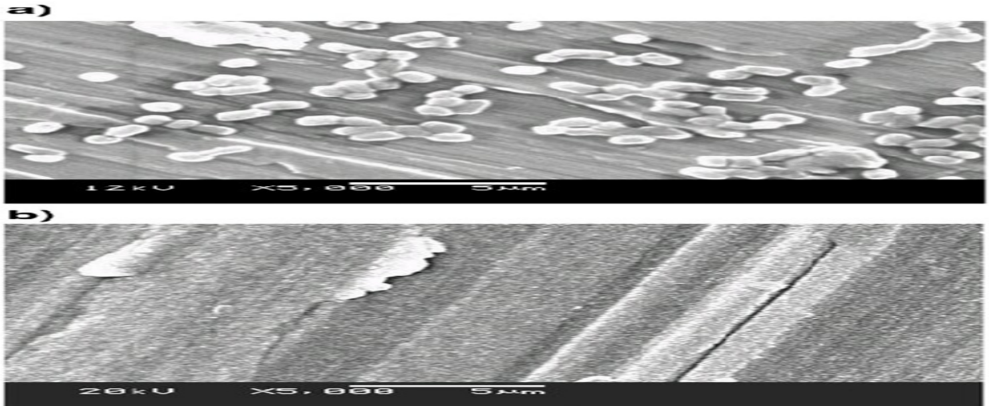

Figure 09: Micrographes électroniques d'*E.coli* retenu sur une surface en inox (a) non recouvert et (b) recouvert de Titanium montrant que les nombres de cellules sont nettement plus faible sur l'inox conditionné de Titanium **(Verran et al.,2010).**

Une relation entre la rugosité et l'adhésion a été trouvée sous l'influence de la température. Il a été montré**,** qu'à 30°C, *L.monocytogenes* forme des biofilms robustes indépendamment de la rugosité et qu'inversement à 15°C, l'aptitude à former le biofilm diminue pour les valeurs les plus faibles de rugosité. Ce qui montre que les divers aspects de la topographie influencent le statut hygiénique de l'acier inoxydable en association avec d'autres facteurs dont il faut tenir compte, comme exprimé dans différentes études**.** En fait, d'après **(Zhang et al.,2011),** les systèmes expérimentaux actuels ne permettent pas d'appréhender l'ensemble des processus physiques chimiques et biologique qui régulent le développement de biofilm ni le conditions environnementales. **(Malek, 2013).**

6. Les propriétés physico-chimiques de surface des bactéries

L'hydrophobicité des cellules est impliquée dans les interactions qui gouvernent l'adhésion aux surfaces comme démontré dans les approches théoriques de ce phénomène .Toutefois la relation de cette propriété fondamentale est encore contestée, sa relation à l'adhésion dans certaines conditions expérimentales n'étant pas évidente.

D'après **(Marshall et Cruickshand, 1973)** les cellules bactériennes s'orientent perpendiculairement aux interfaces dans les systèmes air/eau ou eau/solide grâce aux portions hydrophobes de toute cellule propulsée de la phase aqueuse au système. Les interactions hydrophobes permettent aux cellules bactériennes d'outrepasser les forces répulsives exercées par le substrat et de réaliser l'adhésion. Toutefois des résultats variables sont trouvés dans la littérature. L'hydrophobicité était le facteur majeur de l'adhésion de *P.aeruginosa* à l'inox

30première minutes. Toutefois, pour l'adhésion à l'inox n'était pas liée à l'hydrophobicité et la charge de surface des cellules de bacilles thermophiles mais plutôt à leurs protéines de surfaces. De même, l'hydrophobicité cellulaire des souches de *S.epidermisis* n'avait aucune influence sur leur adhésion à des surfaces hydrophile et hydrophobes. Une absence de corrélation entre l'hydrophobicité et l'adhésion au PVC est notée pour des spores hydrophobes et hydrophiles de souches de *B.cereus***.** Par ailleurs, d'après **(Peng et al.,2011),**l'hydrophobicité de cellules végétatives de *B.cereus* variait selon le stade physiologique, augmentant durant la phase stationnaire. Cette propriété est également affectée par des facteurs environnementaux tels que les conditions de stress. Une augmentation de l'hydrophobicité des cellules de *Lactobacillus* soumises à un stress biliaire, a été observée dans les premières heures de formation du biofilm. D'une manière générale de nombreux travaux**,** ont montré que cette propriété subit des modifications plus ou moins importantes en fonction des conditions environnementales telles que le Ph **(Malek, 2013).**

7. La microflore du biofilm en industrie laitière

La flore constitutive du biofilm en industrie laitière peut-être variée et comprendre de nombreuses espèces aussi bien Gram+ que Gram-, telles que *Streptococcus, Staphylococcus, Listeria, Pseudomonas* et certaines *entérobactéries***.** Néanmoins certains groupes de bactérien comme inféodés au biofilm dans l'environnement des laitiers en raison de conditions sélectives et propices à la croissance de ces taxons. Il s'agit notamment de *Steptococcus thermophilus***,** des bacilles thermophiles et des membres du groupe *B.cereus.* Dans cette synthèse, l'intérêt sera porté sur la flore sporogène aérobie représentée essentiellement par les *bacilles thermophiles* et les membres du groupe *B.cereus.* **(Malek, 2013).**

8. Un nettoyage parfait

Le rôle du nettoyage est d'éliminer toutes traces de salissure présente sur les équipements et matériaux en contact avec les aliments. Ce nettoyage doit se faire, dans la mesure du possible, sans démontage. L'efficacité du nettoyage va dépendre de certains facteurs qui sont : l'action mécanique, l'action chimique (choix du produit de nettoyage),la température et le temps de contact. Ces quatre éléments forment le cercle de SCinner. Il définit et structure la base d'un nettoyage « parfait ».Un nettoyage parfait nécessite l'utilisation de produits adaptés à l'action recherchée (dégraissage, détartrage…),mais aussi aux types de supports à nettoyer .Si l'un des facteurs est diminué, il doit être compensé par les autres facteurs **(Diaby, 2018).**

- **L'action chimique :**

C'est l'action d'un produit alcalin/acide ou d'un détergent sur une surface. La méthode et le produit à employer dépendent de la nature de souillure et de la surface à nettoyer (type de matériel, fragilité).

- **L'action mécanique :**

L'action mécanique c'est l'action de frotter. Elle vise à remettre en suspension les salissures et à les éliminer. Cette action améliore donc l'efficacité des produits de nettoyage en éliminant mécaniquement une partie importante de matières organiques collées à la surface.

- **La température :**

Elle correspond à la température de l'eau. La température joue un rôle important sur l'efficacité des produits de nettoyage. Il est important de respecter la température recommandée par le fabricant pour optimiser l'efficacité du produit. A défaut de recommandations du fabricant, il faut préférer l'eau tiè de(les mains doivent tolérer la température de l'eau.

- **Le temps de contact :**

Ce facteur, le temps d'action ou temps de contact, c'est le temps nécessaire pour que le détergent réagisse avec les salissures afin de pouvoir les déloger. Pour un désinfectant, c'est la durée nécessaire pour que celui-ci inactive un organisme. Ce temps est évalué en laboratoire. Lors de l'application d'un désinfectant sur une surface, il est important de respecter les recommandations du fabricant.

9. Les agents de nettoyage

- **Les agents de nettoyage alcalins :**

Les produits de nettoyage alcalins ont un pH supérieur ou égal à 8. Ils ont différents rôles enlever la croute organique collée sur la surface par des traitements de chaleur, saponifier les lipides saponifiables, dissoudre les matières grasses et dégrader les protéines en acides aminés les ioniser puis les solubiliser. Il y a quatre classes d'agents alcalins décrits ci-dessous**.** Les alcalins forts ont une action très puissante sur les résidus organiques. Cependant, cette catégorie d'agents est corrosive, il est donc préférable de limiter leur utilisation sur les métaux mous et caoutchouc. **(Diaby, 2018).**

Les alcalins forts

Les alcalins forts ont une action très puissante sur les résidus organiques. Cependant, cette catégorie d'agents est corrosive, il est donc préférable de limiter leur utilisation sur les métaux mous et caoutchouc. **(Diaby, 2018).**

Les alcalins moyens

Cette classe contient principalement les phosphates, ils ont un bon pouvoir adoucissant sur l'eau. L'utilisation des alcalins moyens est de plus en plus limitée car ils sont des effets néfastes sur l'environnement **(Diaby, 2018).**

Les alcalins doux

Cette catégorie d'alcalin regroupe principalement des carbonates. Les alcalins doux sont utilisés pour le nettoyage d'équipements en aluminium ou tout autre métal mou. Ils sont également utilisés pour les nettoyages manuels nécessitant un brossage **(Diaby, 2018).**

Les alcalins chlorés

Ils sont souvent utilisés pour aider à décoller les résidus protéiques. L'inconvénient majeur de ces produits est qu'avec le temps, ils endommagent les équipements, surtout si les concentrations recommandées par le fabricant ne sont pas respectées **(Diaby, 2018).**

- **Les agents de nettoyage acides :**

Le rôle des produits de nettoyage acides est de dissoudre les résidus minéraux résultant des aliments, de l'eau ou des réactions chimiques (par exemple :eau/aliments ou eau/aliment/produits de lavage alcalin).On distingue deux classes parmi les agents de nettoyage acides :les acides minéraux et les acides organiques**(Diaby, 2018).**

Les acides minéraux

Les acides minéraux sont couramment utilisés pour leurs propriètés détartrantes et désincrustantes. Les plus courants sont l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique, l'acide phosphorique, l'acide sulfurique et l'acide sulfamique. Tous ces acides sont corrosifs et oxydants même pour l'inox **(Diaby, 2018).**

Les acides organiques

Les acides organiques sont moins dangereux et moins corrosifs que les acides minéraux, car ce sont des acides faibles. Ils ont un pouvoir séquestrant sur certains minéraux. Les acides

organiques ayant une plus faible corrosivité peuvent être utilisés sur les métaux mous tel l'aluminium. Les acides lactiques, citriques, gluconiques, et hydroxyacétiques sont les plus utilisés **(Diaby, 2018).**

Les détergents enzymatiques

Les détergents enzymatiques sont constitués d'un ou de plusieurs enzymes. Leur utilisation peut être judicieuse pour surmonter le problème des biofilms dans l'industrie alimentaire. La matrice d'exopolysaccharides étant hétérogène, un mélange d'enzymes peut être nécessaire pour sa dégradation**.** Les mélanges peuvent être composés d'enzymes telles que les protéases (pour dégrader les protéines), les lipases (pour dégrader les lipides) ou les amylases (pour dégrader l'amidon) **(Diaby, 2018).**

10. La désinfection

La désinfection c'est l'utilisation de produits antimicrobiens pour inactiver, détruire les micro-organismes présents sur un objet ou sur une surface. Elle a pour but de réduire les cellules viables restantes après le nettoyage et d'empêcher leur croissance sur les surfaces après nettoyage. En absence de manière organique (par exemple graisse ou sucre), les désinfectants sont plus efficaces, la désinfection ne peut être efficace qu'après un nettoyage. L'efficacité est également influencée par d'autres paramètres tels que la concentration et le temps de contact du produit, le pH , le température, la dureté de l'eau **.** Le résultat de la désinfection est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération. En n'empêche pas les contaminations ultérieures, c'est pourquoi elle doit être renouvelée régulièrement dans les zones sensibles .En industrie alimentaire, la désinfection à pour but de réduire le nombre de micro-organismes afin qu'ils ne puissent pas affecter la qualité et la sureté des produits alimentaires**.** Il existe différentes classes de désinfectants selon leur action. **(Diaby, 2018).**

Chapitre IV : Les applications de biofilm

Le plus souvent inoffensifs, les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes en participant notamment au cycle du carbone, de l'eau. D'ailleurs, depuis de nombreuses années, le traitement de nos eaux usées s'effectue grâce à l'utilisation empirique de l'activité épuratrice des biofilms bactériens. Les biofilms jouent aussi un rôle essentiel dans de nombreux processus : ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. La coopération métabolique établie au sein du biofilm permet de réaliser ces réactions qui requièrent l'action concertée de bactéries ayant différentes capacités métaboliques. D'autre part, la flore commensale humaine peut être considérée comme un biofilm qui protége son hôte contre les attaques des bactéries pathogènes. Dans l'industrie, les biofilms servent au traitement des déchets par un mécanisme appelé « bioremédiation » **(COHEN, 2002).** Les microorganismes composant les biofilms peuvent en effet utiliser des matériaux polluants comme source de carbone et d'énergie. Ainsi, les biofilms sont employés pour traiter les eaux usées et les décharges, pour dépolluer des sites contaminés et enfin, pour mobiliser les métaux lourds d'un sol ou d'un déchet par le procédé de biolixiviation.

1. Les biofilms dans le traitement des eaux usées

Le traitement des eaux usées avec des systèmes de biofilms présente plusieurs avantages par rapport aux systèmes de croissance en suspension. Une flexibilité opérationnelle, un faible encombrement, un temps de rétention hydraulique réduit, une résilience aux changements de l'environnement, un temps de séjour en biomasse accru, une concentration élevée en biomasse active, une capacité améliorée à dégrader les composés récalcitrants ainsi qu'un taux de croissance microbien plus lent entraînant une production de boues plus faible en sont quelques-uns des avantages des procédés de traitement des biofilms **(Rehali, 2020).**

Les systèmes de biofilms permettent également un meilleur contrôle des taux de réaction et de la dynamique des populations. Les configurations de réacteurs à biofilms appliquées au traitement des eaux usées comprennent des filtres ruisselants, des filtres à média plastique à haut débit, des contacteurs biologiques rotatifs, des réacteurs à biofilms à lit fluidisé, des réacteurs de transport aérien, des filtres granulaires et des réacteurs à cellules immobilisées sur membrane **(Rehali, 2020).**

Une division générale entre les processus à lit fixe et mobile en fonction de l'état du matériau de support est généralement effectuée. Les systèmes à lit fixe comprennent tous les systèmes dans lesquels le biofilm est formé sur des supports statiques tels que des roches, des profils en plastique, des éponges, des supports granulaires ou des membranes **(Rehali, 2020).**
Le flux de liquide à travers les milieux statiques fournit aux microorganismes des nutriments et de l'oxygène.

Les systèmes à lit mobile comprennent tous les processus de biofilms avec des milieux en mouvement continu, maintenus par une vitesse élevée de l'air ou de l'eau ou une agitation mécanique. Le matériau porteur du biofilm (support) est sélectionné en fonction de sa taille, de sa porosité, de sa densité et de sa résistance à l'érosion. En utilisant un matériau ayant une grande surface spécifique (m2 / m3), une activité biologique élevée peut être maintenue en utilisant un volume de réacteur relativement petit. L'épaisseur du biofilm dans les réacteurs est généralement contrôlée en appliquant une force de cisaillement, qui est obtenue en modifiant l'intensité d'agitation, la vitesse d'écoulement ou par lavage à contre-courant **(Rehali, 2020).**

Outre le traitement primaire, secondaire et tertiaire des eaux usées, des systèmes de biofilms ont également été utilisés avec succès pour traiter les eaux usées industrielles. Les biofilms utilisés dans le traitement des eaux usées bénéficient d'un certain nombre de mécanismes d'élimination tels que la dégradation biologique, biosorption, bioaccumulation et biominéralisation **(Rehali, 2020).**

Une biosorption efficace des métaux lourds et des solvants organiques par les composants de la matrice de biofilms a été trouvée. Des réacteurs utilisant la flore microbienne naturelle ou des souches spécifiques ayant la capacité d'éliminer, par exemple, les chlorophénols, le pyrène et le phénanthrène, les n-alcanes, le tétrachlorure de carbone et les effluents mixtes de l'industrie pharmaceutique ont été décrits dans la littérature **(Rehali, 2020).**

L'utilisation de souches bactériennes spécifiques pour améliorer les performances du traitement des eaux usées est appelée bioaugmentation. **Stephenson et Stephenson (1992)** ont défini la bioaugmentation comme un processus qui tente d'améliorer le traitement en augmentant la diversité et / ou l'activité grâce à une introduction directe de microorganismes naturels ou génétiquement modifiés sélectionnés dans le système. Pour parvenir à une bioaugmentation réussie, la survie, l'activité et la rétention des microorganismes inoculés doivent être garanties dans le nouvel environnement **(Rehali, 2020).**

2. Biofilms dans la bioremédiation

2.1. Approches de la bioremédiation

Au cours des dernières décennies, la bioremédiation a été présentée comme une technologie émergente qui peut être largement appliquée in situ pour l'élimination des polluants environnementaux en utilisant des systèmes biologiques de manière efficace et rentable. La dégradation/transformation microbienne est l'une des principales approches utilisées pour la bioremédiation des métaux lourds et des composés organiques tels que les colorants.L'atténuation des polluants environnementaux à l'aide de la communauté microbienne native spécifique au site est une caractéristique unique de la technique de biorestauration. La bioremédiation in situ peut être classée en trois grandes catégories : (I) la bioatténuation (processus naturel de biodégradation), (II) la biostimulation (amélioration du processus de biodégradation par l'ajout d'accepteurs ou de donneurs d'électrons), et (III) la bioaugmentation (ajout de microbes ayant une capacité inhérente de dégradation ou de transformation des polluants sur le site**).** Les bactéries indigènes présentes dans un site contaminé peuvent développer une tolérance aux polluants en modifiant leur composition génétique et peuvent donc être potentiellement utilisées pour le processus de détoxification **(Mohapatra et al , 2020).**

La bioremédiation microbienne des polluants peut être réalisée soit par minéralisation (oxydation/réduction), soit par le processus d'immobilisation (adsorption/absorption). L'élimination bactérienne des métaux implique principalement une adsorption cellulaire ou un piégeage médié par la métallothionéine. La dégradation des composés organiques est réalisée par des enzymes intracellulaires et extracellulaires produites par une variété de gènes tels que pah, nid, nah, et bph**.** Une technique de biorestauration in situ ou ex situ appropriée peut être sélectionnée en analysant plusieurs facteurs tels que le type, la concentration et le niveau de toxicité des polluants, la densité de la population bactérienne indigène et l'état physico-chimique du site. **(Mohapatra et al , 2020).**

2.2. Rôle des biofilms dans la bioremédiation

Les biofilms sont des collections d'espèces uniques ou multiples qui diffèrent de leur phase planctonique (en suspension libre) par leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et génétiques. Les biofilms bactériens sont plus appropriés pour la remédiation des composés récalcitrants et xénobiotiques en raison de leur forte densité de cellules microbiennes, de leur stabilité structurelle, de leur processus de signalisation, de leur diversification métabolique, de leur capacité d'immobilisation et de la présence de molécules tensioactives**.** Les biofilms peuvent potentiellement être utilisés dans le processus de remédiation car ils ont la capacité inhérente de survivre dans la plupart des environnements toxiques avec des mécanismes de résistance plus importants intégrés en raison de la présence de certains**.** Les biofilms bactériens peuvent éliminer efficacement les métaux et les colorants par les mécanismes de bioaccumulation et de biosorption en raison de leur forte densité de biomasse et peuvent également réduire certains métaux et colorants à un niveau de toxicité inférieur grâce à leurs activités enzymatiques. Le biofilm possède divers processus physico-chimiques et biologiques pour lier et transformer les polluants toxiques, y compris les métaux et les colorants, à l'aide d'EPS et de biosurfactants Les caractéristiques polyioniques des EPS du biofilm peuvent aider à lier les ions métalliques, ce qui entraîne la formation de complexes organométalliques par l'action de la force d'attraction électrostatique **(Mohapatra et al , 2020).**

La bioremédiation médiée par les biofilms peut également être facilitée par un transfert de gènes intercellulaire amélioré, l'utilisation de biofilms à population mixte, la biodisponibilité des polluants pour les cellules bactériennes résidant dans le biofilm via la chimiotaxie, et l'optimisation des conditions paramétriques physico-chimiques. La diffusion et le transport de divers ions métalliques, de solutés et de molécules de colorants à travers les pores et les canaux d'eau, ainsi que leur liaison à la surface de la matrice du biofilm, dépendent fortement de la propriété anionique, de la capacité de liaison à l'eau, des densités cellulaires et de la mobilité du biofilm. La propriété de micro-hétérogénéité du biofilm développée par la coexistence de divers micro-environnements au sein de la matrice en fait une application plus prometteuse pour le processus de bioremédiation. Le biofilm bactérien peut être utilisé avec succès dans des conditions ex situ en utilisant différents systèmes de bioréacteurs. Plusieurs types de bioréacteurs, tels que le réacteur à lit fixe, le réacteur à lit garni et le réacteur à lit fluidisé, utilisent également la biomasse du biofilm bactérien pour le traitement/biosorption de l'eau polluée contenant des métaux lourds, des colorants et des hydrocarbures **(Mohapatra et al, 2020).**

2.3. Application des biofilms pour la bioremédiation des métaux lourds

Les changements dans le secteur industriel et la gestion non planifiée des déchets ont augmenté la contamination par les métaux lourds dans le sol, les sédiments et l'environnement aquatique. Bien qu'il existe un certain nombre de techniques qui ont été développées pour l'élimination des ions métalliques en fonction des besoins et de la disponibilité, récemment, la bioremédiation utilisant le biofilm bactérien a gagné en attention en raison de ses plus grands avantages. De nombreux chercheurs ont étudié et rapporté la biosorption de différents métaux lourds tels que Cd(II), Cr(VI), Pb(II), Hg(II), Ni(II), Zn(II), Cu(II), et Mn(II) en utilisant différents types de biomasse bactérienne **(listés dans le tableau 03).** L'application de la biomasse bactérienne indigène telle que *Arthrobacter sp*. SUK 1205, *Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Leptothrix cholodnii* SP-6SL, *Pseudomonas sp.* Lk9, *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Shewanella oneidensis, Penicillium simplicissimum, Stenotrophomonas spp, et Pseudomonas putida* CZ1 isolés de différents sites contaminés par des métaux dans les processus de bioremédiation semblent être efficaces et ont potentiellement éliminé la charge en métaux lourds des déchets contaminés **(tableau 03)**

Tableau 03 : Élimination de divers métaux lourds en utilisant une biomasse bactérienne.

Métal étudié	Organisme utilisé	Commentaire	Références
Ni(II), Cr (VI), et Mg (II)	Arthrobacter sp. SUK 1205	Efficacité de l'élimination du Cr(VI) par le biofilm d'Arthrobacter sp. SUK 1205 était plus efficace par rapport à Ni(II) et Mg(II).	Dey et Paul (2015)
Cr(VI) et Zn(II)	Escherichia coli et Staphylocoque epidermidis	On a constaté que l'E. coli gram-négatif était plus proéminent vers l'intérieur de l'usine. l'élimination du Cr(VI) et du Zn(II) de la solution aqueuse que celle du S. epidermidis gram-positif.	Quiton et al, 2018
Ni, Cu, Zn, Sr, Cd, et Pb	Leptothrix cholodnii SP-6SL	Les espèces bactériennes oxydant le Fe(II) (FeOB) présentent une biorestauration améliorée du Fe(II). ces métaux	Nell et al. (2016)
Cd2+ et Cu2+	Pseudomonas sp. Lk9	La stratégie d'engraissement couche par couche a été appliquée avec succès pour l'élimination de la les métaux lourds des eaux usées avec une grande efficacité.	Luo et al. (2014)
Cr(III)	Bacillus subtilis et Bacillus cereus	L'application de biofilms de Bacillus s'est avérée plus efficace pour le Cr(III) dans les effluents de tannage au chrome.	Sundar et al. (2011)
Cd(II)	Shewanella oneidensis	L'adsorption de Cd sur la cellule de S. oneidensis dépendait du présence d'une liaison sulfhydryle et non sulfhydryle.	Yu et Fein (2015)
Pb(II), Cd (II), et Zn (II)	Penicillium simplicissimum	La biosorption des ions Cd(II), Zn(II) et Pb(II) sur P. simplicissimum a été étudiée. s'est avéré efficace et suit une cinétique pseudo de second ordre et Modèle isotherme de Langmuir.	Fan et al. (2008)
Zn(II) et Mn(II)	Stenotrophomonas spp.	L'efficacité du biofilm pour l'élimination du zinc et du manganèse était sont respectivement de 69,9% et 78,4%.	Pani et al. (2017)
Cu(II) et Zn(II)	Pseudomonas putida CZ1	La capacité d'adsorption des deux métaux à la surface des cellules de P. putida est la suivante excellent.	Chen et al. (2005)
Hg(II)	Bacillus subtilis	L'adsorption de l'hydroxyde de Hg(II) neutre sur la surface bactérienne a été efficace avec le modèle de complexation de surface (SCM).	Daughney et al. (2002)

2.4. Application des biofilms pour la biorémédiation des colorants

Plusieurs biomasses bactériennes ont été utilisées pour l'élimination biologique des colorants toxiques des déchets contaminés par des colorants, comme l'ont rapporté divers chercheurs **Tableau 04**. La littérature a montré que les bactéries telles que *Vibrio fischeri, Bacillus amy-loliquefaciens, Bacillus sp.* AK1, *Lysinibacillus sp*. AK2, *Kerstersia sp.* VKY1, *Enterococcus faecalis, P. aeruginosa, Aeromonas sp, Pseudomonas luteola, E. coli, B. subtilis, Staphylococcus aureus* et la souche DY1 de *Pseudomonas sp*. ont été capables d'éliminer efficacement certains des principaux colorants tels que le cristal violet, le méthyl orange, le colorant amarante, l'acid orange 7, le vert malachite, le rouge réactif 22, le bleu réactif 5, le violet réactif 2 et le jaune réactif 2, le noir acide 172 **(Tableau 04) (Mohapatra et al, 2020).**

Tableau 04 : Élimination de divers colorants toxiques en utilisant une biomasse bactérienne.

Colorants étudiés	Organisme utilisé	Commentaire	Références
Rouge brillant réactif X-3B	Vibrio fischeri	Réacteur tridimensionnel à biofilm et électrode (3D-BER) constitue une alternative appropriée pour l'élimination des azoïques. colorants à partir d'eaux usées contaminées.	Liu et al. (2017)
Violet cristal (CV)	Bacillus amyloliquefaciens	La capacité d'adsorption maximale pour CV a été trouvée pour être de 582,41 mg/g, par B. amyloliquefaciens.	Sun et al. (2016)
Orange méthylique (MO)	Cyanobactéries	Le périphyton préparé à partir de cyanobactéries revendiquant comme	Shabbir

3. Biofilms électroactifs

Il est bien connu depuis la moitié du XXème siècle que les micro-organismes sont capables de convertir de la matière organique en électricité dans un système appelé pile à combustible (PAC) microbienne **(Parot, 2007).**

Une PAC est composée d'un compartiment anodique et d'un compartiment cathodique séparés par une membrane échangeuse d'ions. Dans le compartiment anodique, une culture de bactéries oxyde un donneur d'électrons tel que l'acétate ou le glucose. Les électrons issus de cette oxydation sont transmis à l'anode par l'intermédiaire d'une ou plusieurs réactions d'oxydoréduction. L'anode est connectée à la cathode via un circuit électrique externe dans lequel les électrons circulent. Les électrons arrivant à la cathode et les

protons qui diffusent du compartiment anodique à travers la membrane permettent d'effectuer une réduction, en général celle de l'oxygène en eau **(Figure 10) (Parot, 2007).**

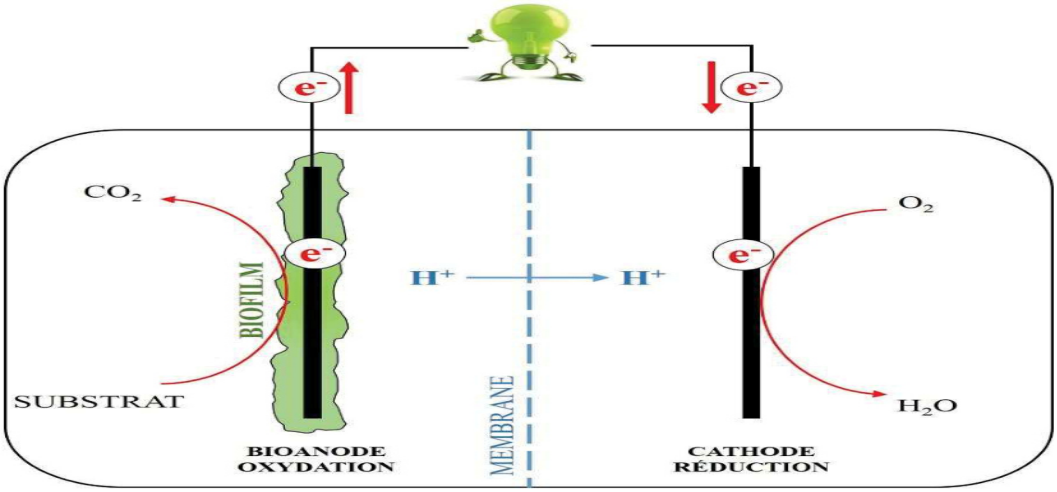

Figure 10 : Schéma de fonctionnement d'une pile à combustible microbienne.

Il y a quelques années, un nouveau type de PAC microbienne a été découvert par Reimers et Tender (***Reimers et al, 2001***). Cette découverte a révolutionné la recherche portant sur les interfaces micro-organismes/matériaux puisqu'il s'est avéré que les bactéries du biofilm étaient capables de transférer les électrons directement à l'anode. Nous n'aborderons cependant pas ici les mécanismes de transfert électronique. Par ailleurs, contrairement aux PACs microbiennes précédentes qui utilisaient des cultures pures de bactéries et des substrats identifiés, cette nouvelle PAC microbienne fournit de l'électricité à partir de sédiments marins, un environnement naturel renfermant une flore microbienne indigène et de la matière organique naturelle**.** Elle est constituée d'une anode enfoncée de quelques centimètres dans les sédiments marins connectée via une résistance externe à la cathode placée au dessus, dans l'eau de mer. Par ailleurs il a été montré que les micro-organismes des sédiments à l'origine de la production d'énergie sont adhérés sous forme de biofilm sur la surface de l'anode **(Figure 11).** Ce biofilm est qualifié d'électroactif car il est capable d'échanger des électrons avec le support conducteur à la surface duquel il se développe. Le principe de la PAC microbienne en sédiment est basé sur la conversion de la matière organique des sédiments par des micro-organismes en produits de fermentation, le plus connu étant l'acétate. Les micro-organismes adhérés sur l'électrode oxydent ces produits de fermentation en CO_2 en transférant les électrons à l'électrode. Ces électrons migrent

ensuite par le circuit électrique extérieur jusqu'à la cathode placée dans l'eau de mer pour effectuer la réduction de l'oxygène **(Parot, 2007).**

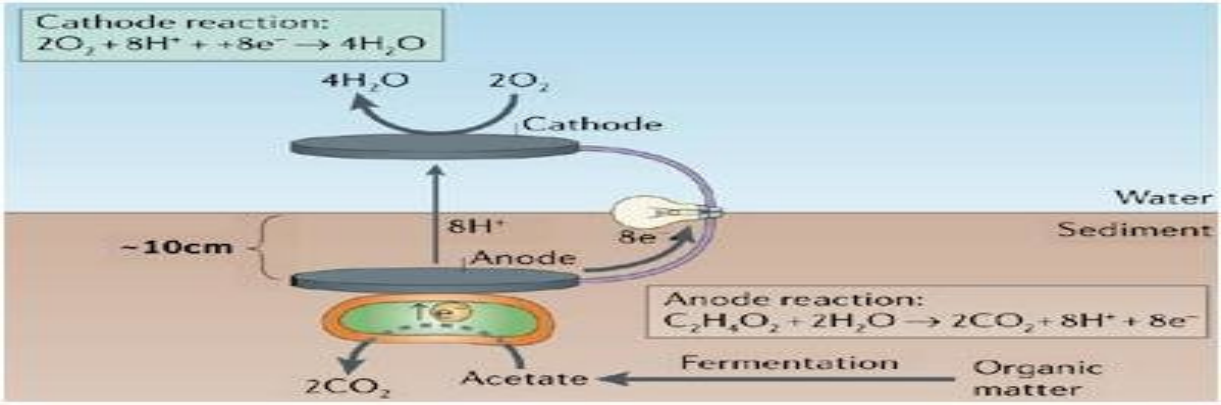

Figure 11 : Schéma de la pile à combustible microbienne en sédiments marins **(d'après *Lovley, 2006a*).**

La PAC microbienne en sédiments marins a ouvert la voie à une nouvelle génération de PACs microbiennes fonctionnant avec un biofilm électroactif anodique issu de divers environnements naturels comme catalyseur de la réaction d'oxydation **(Parot, 2007).**

La majorité des études ont été alors focalisées sur les bioanodes car la réaction cathodique est non limitant mais quelques travaux concernent également les biocathodes où les biofilms sont utilisés comme catalyseurs de la réduction cathodique **(Parot, 2007).**

CONCLUSION

Conclusion

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles.

Comme nous l'avons repris à divers niveaux du présent travail, l'importance des biofilms tient, entre autres, à la formation de résistances et à la difficulté d'imprégnation par les antibiotiques. La présence de biofilms a un impact considérable, que ce soit dans l'industrie ou le milieu médical tels la formation de biofilms sur les dispositifs médicaux (cathéters, implants…) qui en conséquence des problèmes économiques et sanitaires.

Une fois le biofilm formé il est très difficile de l'éliminer. Les bactéries dans un biofilm, dites bactéries sessiles, présentent en effet des propriétés phénotypiques qui les distinguent de leurs homologues planctoniques. D'où, la nécessité de prévenir leur formation et/ ou de leur élimination à partir de stratégies mieux adaptées à ce mode de vie en communauté. Leur présence lors d'infections demande donc de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement.

Malgré la liste des problèmes engendrés par les biofilms, tous les biofilms ne sont pas néfastes pour l'homme et ils jouent même un rôle positif dans bien des domaines. Un des meilleurs exemples pour illustrer les effets bénéfiques des biofilms est leur mise en application dans le domaine du traitement des effluents et de l'eau potable .Dans la nature, les biofilms ont des impacts bénéfiques multiples, puisqu'ils sont responsables dans le sol du recyclage des nutriments, ils jouent un rôle important dans la production d'oxygène, dans la fixation du carbone et de l'azote, mais également dans les processus de biominéralisation ou de bioremédiation. Dans l'industrie, les biofilms sont de plus en plus utilisés par les biotechnologies ; ils interviennent dans de nombreux procédés dans des secteurs tels que l'industrie agro-alimentaire ou l'industrie de raffinage. La production biotechnologique par des cellules fixées et organisées en biofilms présente plusieurs avantages, notamment de pouvoir produire de grands volumes sur un long terme et d'éviter la perte de temps induite par les redémarrages de production .Depuis quelques années, la découverte de la capacité de certains biofilms, appelés biofilms électroactifs, à échanger des électrons de manière directe avec les métaux, ouvre de nouvelles perspectives technologiques. En premier lieu, leur pouvoir de développer de nouvelles sources d'énergie peu coûteuses. Les biofilms électroactifs sont donc le sujet d'un nouveau domaine de recherches en pleine expansion faisant intervenir différentes disciplines dominées par l'électrochimie et la microbiologie. Néanmoins ce mode de vie en biofilm est un processus complexe et reste un sujet vaste à explorercar ces biofilms positifs peuvent devenir nos alliés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

-Auger.M, 2012. Formation de Biofilm in vitro par des souches cliniques de *Escherichia coli :* impact de la modification des conditions expérimentale.[Université de NANTES].

-Bezoui.M, 2016. Biofilms Bactériens et leur implication en pathologie humaine.[Université Mohammed V-Rabat].

-Chen,X.C., Wang,Y.P., Lin,Q., Shi,J.Y., Wu,W.X., Chen,Y.X., 2005. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution byPseudomonas putidaCZ1. Colloids Surf. B Biointerfaces 46 (2), 101-107.

-Chibi.A, 2015. Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen.[Université Aboubekr Belkaid Tlemcen].

-Clutterbuck.A.L, Woods.E.J, Knottenbelt.D.C, Clegg.P.D, Cochrane.C.A, Percival.S.I,2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine .Veterinany Microbiology.121.(1-2) ;1-17

-COHEN.Y,2002. Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int. Microbiol.*,**5**, 189-193.

-Costerton.J.W, GeeseyG-G, Cheng.K.J,1978. « How Bacteria Stick Sci A M » 238 ; 86-95.

-Costerton.J.W, Stewart.P.S. & Greenberg.E.P,1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.

-Diaby.K, 2018. Les biofilms en industrie agroalimentaire optimisation de leur élimnation.[Université LILE 2].

-Daughney, C.J., Siciliano, S.D., Rencz, A.N., Lean, D., Fortin, D., 2002. Hg (II) adsorption by bacteria: a surface complexation model and its application to shallow acidic lakes and wetlands in Kejimkujik National Park, Nova Scotia, Canada. Environ. Sci. Technol. 36 (7), 1546–1553.

-Dey, S., Paul, A.K., 2015. Réduction du chromate hexavalent pendant la croissance et par des cellules immobilisées d'Arthrobactersp. SUK 1205.Science 34 (3), 158-168.Dey, U., Chatterjee, S., Mondal, N.K., 2016. Isolement et caractérisation des bactéries résistantes à l'arsenic et application possible en biorémédiation. Bio-technol. Rep. (Amst.) 10, 1-7.

-Donlan, R.M., 2002. Biofilms : la vie microbienne sur les surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8, 881–890.

-Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms : mécanismes de survie des micro-organismes cliniquement pertinents. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167-193.

-Donlan, R. M. (2011). Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis* 52, 1038-1045.

-Faille C,Carpentier B.2009. Food contact surfaces,surface soiling and biofilm formation.In :Fratamico PM,Annous BA,Gunther NW.IV,editors.Biofilms inthe food and beverage industries.Oxford,Cambridge,New Delhi :Wood head Publishing Limited.p304 30.

-**Fan, T., Liu, Y., Feng, B., Zeng, G., Yang, C., Zhou, M., et al. 2008.** Biosorption du cadmium (II), du zinc (II) et du plomb (II) par Penicillium simplicissimum : isothermes, cinétique et thermodynamique. J. Hazard. Mater. 160 (2–3), 655–661.

-**Fux, C.A., Stoodley, P., Shirtliff, M. and Costerton, J.W. (2009).** The Functional Resistance of Bacterial Biofilms. Antimicrobial Drug Resistance Chapter 11, 121-131.

-**Henerici A.T. (1932).** « Studies of Fresh Water Bacteria: I.A Direct Microscopie Technique. »Journal of bacteriology25(3) ,277.

-**Hilbert L R,D Bagge-Ravn,J Kold,L Gram.2003.**Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and cocrrosion resistance.Tnternational joirnal of biodéterioration and biodegradation,52.175-185.

-**Liu, S., Feng, X., Gu, F., Li, X., Wang, Y., 2017.** Réduction/oxydation séquentielle des colorants azoïques dans un réacteur tridimensionnel à biofilm-électrode. Chemosphere 186, 287-294.

-**Long, J., Luo, D., Chen, Y., 2014.** Identification et caractérisation de la biosorption d'une souche résistante au thallium. Chin. J. App. Environ. Biol. 20, 426-430.Luo, S., Li, X., Chen, L., Chen, J., Wan, Y., Liu, C., 2014. Stratégie de couche par couche pour l'engraissement de la capacité d'adsorption de la biomasse bactérienne endophyte pour.élimination très efficace des métaux lourds. Chimie. Eng. J. 239, 312–321.

-**Lovley D.R.,2006a.** Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 327-332.

-**Malek.F, 2013.**Le biofilm en industrie laitière : caractérisation, facteurs de développement et élimination. Cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laiteries de la région de Tlemcen.[Université Aboubekr Belkaid].

-**Marchall K.C.R.H.Cruickshank.1973.**Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces.Archiv fur Mikro biologie,91 :29-40.

-**Marchand,S.J.De Block,V.e De Jonghe ,A.Coorevits ,M.Heyndickx ,L.Herman. 2012.**Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments ;Influence on Milk Quality and Safety Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety ,11 :133-147.

-**Mohapatra.R.K, Behar.S.S, Patra.K.**Potential application of bacterial biofilm for bioremediation of toxic heavy metals and dye-contamined environments.In New and Future

Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms.2020.p267-281.

-**Nell, R.M., Szymanowski, J.E., Fein, J.B., 2016.** Adsorption de cations de métaux divalents sur des cellules bactériennes Leptothrix cholodnii SP-6SL. Chem. Geol.439, 132–138.

-**O'TooleG.A.,Kaplan HB.,Kolter R.(2000).**Biofilm formation an microbialdevelopmentThe Animal Review of Microbiology.54 :49-79.crobEcol40.75-8'.

-**Pani, T., Das, A., Osborne, J.W., 2017.** Biorestauration du zinc et du manganèse par le biofilm bactérien : une approche basée sur le bioréacteur. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 175, 211-218.

-**Parot.S, 2017.**Biofilms Electroactifs.[Institus national polytechniques de Toulouse].

-**Quiton, K.G., Doma, J.B., Futalan, C.M., Wan, M.W., 2018.** Élimination du chrome (VI) et du zinc (II) d'une solution aqueuse à l'aide de biofilms bactériens supportés par du kaolin.terial supporté par du kaolin de E. coli à Gram négatif et de Staphylococcus epidermidis à Gram positif. Sustain. Environ. Res. 28 (5), 206-213.

-**Rahali.A, 2020.**Dépollution des eaux urbaines par les nanochitosanes et les biofilms.[Université Abdel Hamid Ibn Badis Mostaganem].

-**Shabbir, S., Faheem, M., Ali, N., Kerr, P.G., Wu, Y., 2017.** Les biofilms de périphyton : un système biologique nouveau et naturel pour l'élimination efficace du colorant azoïque sul-phonated azo dye methyl orange by synergistic mechanism. Chemosphere 167, 236-246.

-**Stephenson D. et Stephenson T. (1992).** Bioaugmentation for anhancing biological wastewater treatment. Biotechnological advances. 10 (4): 549-559.

-**Stewart, P. S. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *In J Med Microbiol* 292, 107-113.

-**Stoica.P, Chifiriuc.M.C, Rapa.M, Lazar.V.**Overview of biofilm-related problems in medical devices.In Biofilm and Implantable Medical Devices.**2017**,p 3-23.

-**Sun, P., Hui, C., Wang, S., Wan, L., Zhang, X., Zhao, Y., 2016.** Le biofilm de Bacillus amyloliquefaciens comme un nouveau biosorbant pour l'élimination du cristal violet de la solution. Colloïdes Surf.B Biointerfaces 139, 164-170.

-**Sundar, K., Sadiq, I.M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2011.** Biorestauration du chrome trivalent en utilisant desbiofilms de Bacillusà travers un réacteur à flux continu. J. Hazard. Mater. 196, 44–51.

-**Sutherland I.W.(2001(b)).**The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment .Trends in Microbiology.9.222-227.

-**Van Houdt,R.&Michiels,C.W.(2005).**Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. Res Microbiol156,626-633.

-Verran J,Packer A,Kelly P,Whitehead KA.2010. Titanium-coating of stainless as an aid to improved cleanability.Int.J.Food Microbiol.,141.Supplement 1 :S134-9.

-**Virgine.L, 2008.**Influence du cuivre sur les biomasses microbiennes dans les canalisation d'eau.[Université PARIS-SUD 11].

-**Whitehead K.A.J.Verran.2006**.The effect of surface topography on the retention of microorganisms.Trans IChem E,Part C,Food and bioproducts Processing,84 :253-259.

-**Yu, Q., Fein, J.B., 2015**. L'effet de la charge métallique sur l'adsorption de Cd sur les enveloppes cellulaires bactériennes de Shewanella oneidensis : le rôle des sites sulfhydryles.Géochim. Cosmochim. Acta 167, 1-10.

-**Zhang W.,T.S.Sileika,C.Chen,Y.Liu ,J.Lee,A.I.Packman.2011.**A novel planar flow cell for studies of biofilm heterogeneity and flow-biofilm interactions.Biotechnology and Bioengineering,208:2571-2582.