

ANNEE 2012

N°063

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional
le 24 octobre 2012
par Myriam AUGER

Conformément aux dispositions de l'arrêté
Du 6 mai 1987 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques de *Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales.

Président du jury : Monsieur le Pr. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie et de Mycologie – Faculté de Pharmacie – Nantes

Membres du jury : Monsieur le Pr. Eric BATARD, Professeur de Thérapeutique – Faculté de Médecine – Nantes

Monsieur le Dr. Stéphane CORVEC, Maître de conférences de Bactériologie – Faculté de Médecine – Nantes

Madame le Dr. Nathalie CAROFF, Maître de conférences de Bactériologie – Faculté de Pharmacie – Nantes

Sommaire

Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	7
INTRODUCTION.....	8
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
I. Formation des biofilms.....	10
I-1. Définition	10
I-2. Etapes de formation des biofilms.....	10
I-2-1. L'adhérence réversible.....	10
I-2-2. L'adhérence irréversible	11
I-2-3. Le développement précoce du biofilm.....	11
I-2-4. La maturation du biofilm	11
I-2-5. Le détachement de bactéries	12
II. Importance clinique des biofilms	14
II-1. Résistance des bactéries au sein des biofilms	14
II-1-1. Aux défenses de l'hôte.....	14
II-1-2. Aux antibiotiques et désinfectants	15
II-2. Infections impliquant les biofilms.....	17
II-3. Biofilm et infections sur matériel.....	18
II-3-1. Les infections associées au sondage urinaire.....	19
II-3-2. Les infections associées aux cathéters vasculaires	26
II-3-3. Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique	30
II-3-4. Les infections ostéo-articulaires sur matériel	32
II-4. Prévention et traitement des infections liées aux biofilms.....	34
II-4-1. Moyens de lutte contre la formation des biofilms	34
II-4-2. Techniques d'élimination du biofilm.....	35
III. Le biofilm chez <i>Escherichia coli</i>	38
III-1. Rappels sur <i>E. coli</i> et son pouvoir pathogène	38
III-2. Déterminants de la formation de biofilm chez <i>E. coli</i>	39
III-2-1. Les flagelles	39
III-2-2. Les fimbriae (ou pili)	40
III-2-3. Les auto-transporteurs de type V	43
III-2-4. Les polysaccharides de la matrice du biofilm.....	45
III-2-5. Les polysaccharides à la surface bactérienne	46
III-3. Comparaison avec d'autres micro-organismes d'intérêt médical	50
III-3-1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
III-3-2. Staphylocoques	50
III-3-3. <i>Candida albicans</i>	51

IV. Méthodes d'étude <i>in vitro</i> des biofilms	50
IV-1. Mesure de la biomasse	51
IV-1-1. Crystal Violet	51
IV-1-2. Syto9	52
IV-2. Mesure de la viabilité cellulaire	52
IV-2-1. XTT (sel de tétrazolium).....	52
IV-2-2. Résazurine.....	53
IV-2-3. FDA (fluorescéine diacétate)	53
IV-3. Mesure de la matrice : le DMMB (1,9-dimethyl methylene blue).....	54
IV-4. BioFilm Ring Test®	54
IV-5. Méthodes dynamiques.....	55
 MATERIEL ET METHODES.....	 56
I. Objectifs de l'étude	56
II. Souches bactériennes	56
III. Les tests de formation de biofilm en microplaque	57
III-1. Culture bactérienne	57
III-2. Test au Crystal Violet	58
III-3. Méthode BioFilm Ring Test®	58
III-4. Variation des conditions expérimentales	59
III-5. Classification des isolats	60
III-6. Analyse statistique	60
IV. Etude de la mobilité des souches	60
V. Recherche des gènes <i>pgaA</i>, <i>csgA</i> et <i>fimH</i> par PCR	60
VI. Recherche de l'expression de <i>fimH</i> et <i>csgA</i> par RT-PCR	61
VI-1. Culture bactérienne	61
VI-2. Extraction des ARN bactériens	62
VI-3. RT-PCR.....	62
 RESULTATS	 63
I. Détection de la production de biofilm par les 10 souches de <i>E. coli</i>	63
I-1. Méthode au Crystal Violet	63
I-2. Méthode du BioFilm Ring Test®	65
I-3. Corrélation entre les deux méthodes	66
II. Influence des conditions de culture	67
II-1. Influence de la durée d'incubation.....	67
II-2. Influence de l'atmosphère d'incubation.....	68
II-3. Influence du milieu de culture	70
II-3-1. Comparaison des milieux BHI et LB.....	70
II-3-2. Comparaison des milieux LB et LB supplémenté en glucose	71
III. Etude des mécanismes susceptibles d'influencer la production de biofilm	72
III-1. Etude de la mobilité des souches	72

III-2. Etude de gènes impliqués dans la formation de biofilm	73
III-2-1. Recherche des gènes <i>pgaA</i> , <i>csgA</i> et <i>fimH</i> par PCR	73
III-2-2. Etude de l'expression de gènes impliqués dans la production de biofilm.....	74
DISCUSSION	76
CONCLUSION.....	80
BIBLIOGRAPHIE	83

Liste des abréviations

AFU : Association Française d'Urologie
ALS : Agglutinin-Like Sequence
ARN : Acide Ribonucléique
BFI: Biofilm Formation Indice
BHI : Brain Heart Infusion
BLSE: β -lactamase à Spectre Etendu
BRT : Biofilm Ring Test[®]
CAUTIs : Catheter-Associated Urinary Tract Infections
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CLSM : Microscope Confocal à balayage Laser
CRIOGO : Centre de Référence pour la prise en charge des Infections Ostéo-Articulaires du Grand Ouest
DMMB : DiMethyl-Methylene-Blue
DO : Densité Optique
EDTA : Ethylène DiamineTétraacétique Acide
FDA : Fluorescéine Diacétate
HAS : Haute Autorité de Santé
IOAM : Infection Ostéo-Articulaire sur Matériel
LB : Luria Bertani
LPS : LipoPolySaccharide
MSCRAMMs : Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAVM : Pneumopathie Acquisée sous Ventilation Mécanique
PCR : Polymerase Chain Reaction
PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin
PGA : Poly- β -1,6-N-Acétyle-Glucosamine
PNAG : Polymer of N-Acetyl Glucosamine
PTFE : PolyTétraFluoroÉthylène
PVC : Polychlorure de Vinyl
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
SAD : Sonde à Demeure
SBF : Specific Biofilm Formation
SFAR : Société Française d'Anesthésie et de Réanimation
SFHH : Société Française d'Hygiène Hospitalière
SFM : Société Française de Microbiologie
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique
SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
TS : Trypticase Soja

Liste des figures

Figure 1 :	Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm..	13
Figure 2 :	Photographies par microscopie électronique de biofilms de 24 heures formés par un bacille à Gram négatif <i>Burkholderia cepacia</i> et un cocci à Gram positif <i>Staphylococcus sp</i>	13
Figure 3 :	Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte.....	14
Figure 4 :	Hypothèses de mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques.....	17
Figure 5 :	Principales voies d'acquisition des micro-organismes lors d'un sondage vésical.....	22
Figure 6 :	Développement de biofilms bactériens sur une sonde urinaire observé par microscopie électronique	23
Figure 7 :	Principales voies d'acquisition des micro-organismes en présence d'un cathéter vasculaire	28
Figure 8 :	Photographie par microscopie électronique de souches de <i>E. coli</i> exprimant des flagelles.	40
Figure 9 :	Photographie par microscopie électronique d'une souche de <i>E. coli</i> productrice de fimbriae de type 1.....	41
Figure 10 :	Photographie par microscopie électronique d'une souche productrice de curli et d'une souche non productrice de curli.....	43
Figure 11 :	Représentation schématique des principaux déterminants de la formation de biofilm chez <i>E. coli</i>	47
Figure 12 :	Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques.....	50
Figure 13 :	Principe de la mesure de la biomasse par la méthode au Crystal Violet	51
Figure 14 :	Toxicité du Crystal Violet.....	52
Figure 15 :	Principe de la méthode BioFilm Ring Test®	55
Figure 16 :	Photographie d'une microplaque après redissolution du Crystal Violet.....	64
Figure 17 :	Photographie d'une microplaque en méthode Ring Test®	66
Figure 18 :	Corrélation entre les méthodes Crystal Violet et BioFilm Ring Test®	66
Figure 19 :	Photographie d'une gélose mobilité après 7h d'incubation	72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fréquence relative des micro-organismes isolés dans les bactériémies nosocomiales à porte d'entrée potentiellement associée à un dispositif invasif dans un groupe d'établissements de santé.....	18
Tableau 2 : Principaux micro-organismes isolés dans les infections urinaires.....	24
Tableau 3 : Présentation des dix souches de notre cohorte.....	57
Tableau 4 : Composition des milieux BHI et LB.....	59
Tableau 5 : Indice de formation de biofilm (SBF) calculé pour l'ensemble des souches testées par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI incubé en aérobiose. ...	64
Tableau 6 : Indice de formation de biofilm (BFI) calculé pour l'ensemble des souches testées par la méthode Ring Test® en milieu BHI filtré incubé en aérobiose.....	65
Tableau 7 : SBF calculé pour l'ensemble des souches testées par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI incubé 24 h et 48 h.	67
Tableau 8 : SBF calculé pour l'ensemble des souches de <i>E. coli</i> par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI incubé en aérobiose et en anaérobiose.	68
Tableau 9 : BFI calculé pour l'ensemble des souches de <i>E. coli</i> par la méthode Ring Test® en milieu BHI filtré incubé en aérobiose et en anaérobiose.	69
Tableau 10 : SBF calculé pour l'ensemble des souches de <i>E. coli</i> par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI et en milieu LB incubés en aérobiose.	70
Tableau 11 : SBF calculé pour l'ensemble des souches de <i>E. coli</i> par la méthode au Crystal Violet en milieu LB et en milieu LB supplémenté par 0,5% de glucose incubés en aérobiose.....	71
Tableau 12 : Diamètre de mobilité en cm mesuré sur gélose mobilité après 7h d'incubation.	73
Tableau 13 : Recherche de gènes de virulence <i>pgaA</i> , <i>csgA</i> et <i>fimH</i> par PCR.	74
Tableau 14 : Moyenne des Ct obtenus pour <i>gapA</i> et des ratios pour <i>fimH</i> et <i>csgA</i> des souches testées par RT-PCR.....	75

INTRODUCTION

Les bactéries peuvent adopter deux modes de vie différents : elles sont soit libres et isolées dans un milieu (état planctonique), soit attachées à une surface où elles vivent en communauté au sein d'un biofilm (état sessile). Claude E. Zobell a été l'un des premiers chercheurs à observer des biofilms en 1943, mais le terme biofilm a été utilisé pour la première fois par Costerton en 1978. Leur mise en évidence a longtemps été anecdotique ; le développement de méthodes d'observation telles que la microscopie confocale à balayage laser a permis de montrer que les biofilms sont une communauté structurée de micro-organismes avec une architecture complexe. Durant les vingt dernières années, le nombre de publications scientifiques concernant les biofilms a considérablement augmenté. Ce mode de vie en biofilm procure aux micro-organismes le constituant une protection mécanique contre différents facteurs d'agression : le système immunitaire de l'hôte, les agents antimicrobiens et les facteurs environnementaux comme la dessiccation, les ultra-violets ou les changements de température. De plus, les contacts rapprochés entre les micro-organismes au sein du biofilm favorisent le partage de métabolites produits permettant une économie d'énergie. Ainsi, 99 % des bactéries dans la nature seraient rencontrées sous la forme de biofilm (Donlan & Costerton, 2002), et l'état planctonique pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à une autre.

Les biofilms ont un impact considérable dans des secteurs très variés : dans le domaine agro-alimentaire où ils posent des problèmes de contamination des aliments, dans l'industrie en raison de leur capacité de recouvrir et corroder les matériaux comme les canalisations ou les coques de bateaux, mais également dans le domaine médical, puisque 65 % des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms (Filloux & Vallet, 2003). On pense par exemple aux légionelles, bactéries responsables de pneumopathies souvent sévères, capables de former des biofilms très difficiles à éliminer dans les canalisations des réseaux d'eau chaude sanitaire, mais aussi à toutes les infections associées à des dispositifs médicaux. *Escherichia coli* est l'un des micro-organismes les plus fréquemment isolés dans ce contexte, avec les Staphylocoques, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*.

Cette bactérie « au double visage », à la fois commensale inoffensive du tube digestif et parfois redoutable pathogène, est capable de s'adapter à différents environnements. Le mode de vie en biofilm constitue l'un de ces mécanismes d'adaptation. Le génome de certaines souches peut révéler un panel de différents facteurs de virulence, dont les facteurs d'adhérence tels que les flagelles, les curli ou les fimbriae de type 1, qui contribuent à la formation de biofilm. De nombreuses études ont été réalisées sur le biofilm formé par cette bactérie, mais le plus souvent sur des souches de laboratoire, sans que les mécanismes impliqués et leur régulation puissent être précisément déterminés.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé une étude sur la formation de biofilm dans différentes conditions expérimentales par des souches de *E. coli* isolées dans divers contextes cliniques au laboratoire de Bactériologie.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Formation des biofilms

I-1. 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 (Costerton *et al.*, 1999; Espinasse *et al.*, 2010; Van Houdt & Michiels, 2005). Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes (Behlau & Gilmore, 2008).

I-2. 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 (figure 1) :

I-2-1. 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 (Beloin *et al.*, 2008). 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.

I-2-2. 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 (Beloin *et al.*, 2008; Van Houdt & Michiels, 2005).

I-2-3. Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique.

I-2-4. 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, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (Filloux & Vallet, 2003; Tenke *et al.*, 2006). 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 (Jacobsen *et al.*, 2008). Un biofilm est approximativement constitué de 85 % de matrice extracellulaire et de 15 % de micro-organismes (Behlau & Gilmore, 2008). 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 (Beloin *et al.*, 2008). Cette matrice a un rôle protecteur et un rôle structural.

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 (Tolker-Nielsen & Molin, 2000). 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 (Behlau & Gilmore, 2008). 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 (Filloux & Vallet, 2003).

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 (Trautner & Darouiche, 2004a).

I-2-5. Le détachement de bactéries

La densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 cellules/cm² (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). 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 seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (Kaplan, 2010). Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries.

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

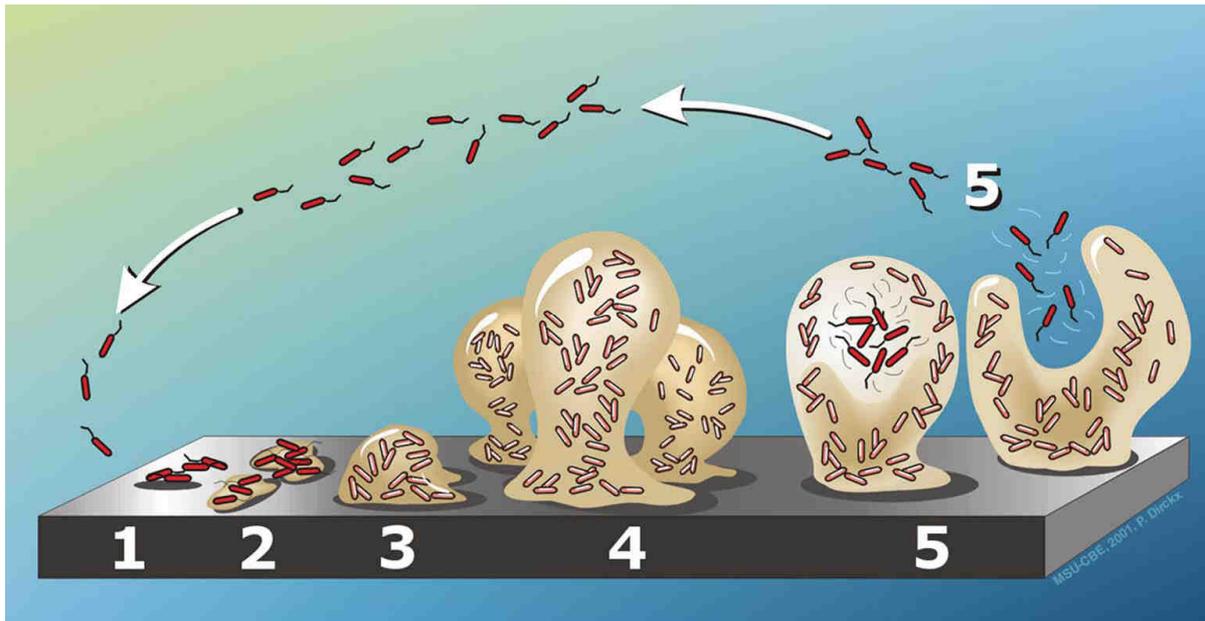


Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm (Van Houdt & Michiels, 2005)

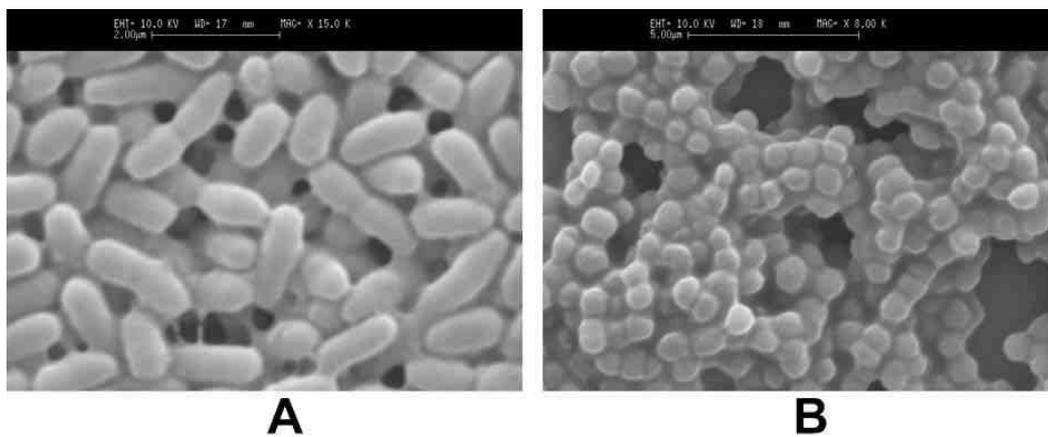


Figure 2 : Photographies par microscopie électronique de biofilms de 24 heures formés par A) un bacille à Gram négatif *Burkholderia cepacia* et B) un cocci à Gram positif *Staphylococcus sp.* (Simoes, 2011).

II. Importance clinique des biofilms

II-1. Résistance des bactéries au sein des biofilms

II-1-1. 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 3, 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 3, étape b). Les phagocytes vont libérer leurs enzymes phagocytaires sur place (Figure 3, étape c), ce qui induit une réponse inflammatoire qui endommage les tissus environnants et libère des bactéries du biofilm (Figure 3, étape d). Une bonne immunité cellulaire et humorale ne suffit donc pas pour éliminer un biofilm.

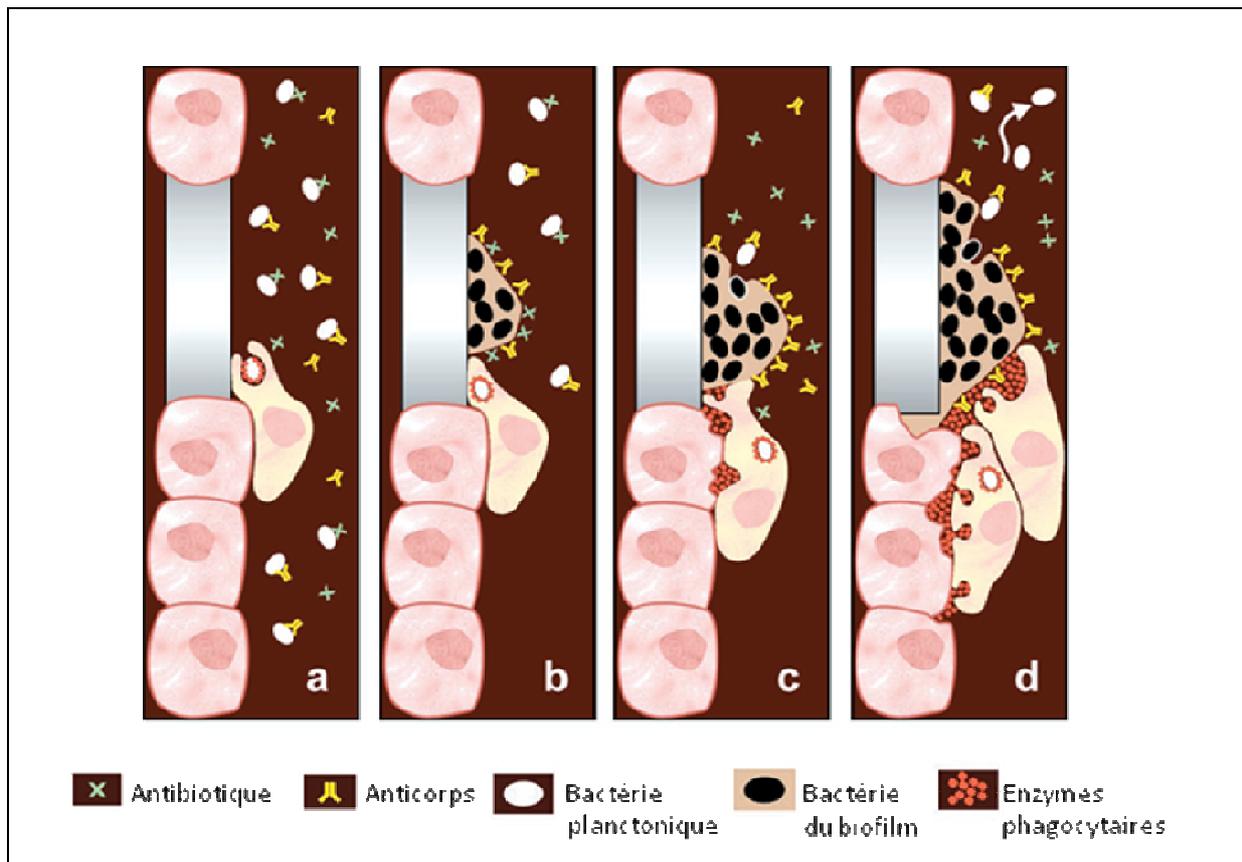


Figure 3 : Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte (Costerton *et al.*, 1999).

II-1-2. Aux antibiotiques et désinfectants

Les bactéries vivant au sein du biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques et désinfectants que leurs homologues planctoniques (Bridier *et al.*, 2011; Simoes, 2011). 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 (Simoes, 2011). 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. Plusieurs mécanismes sont impliqués :

a) 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 (Bridier *et al.* 2011). Dans le cas des petites molécules, cette barrière permet uniquement de ralentir le passage (Lewis, 2001). 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 (Fux *et al.*, 2005; Lewis, 2001). De plus, le retard de pénétration des molécules peut aussi favoriser l'activité inhibitrice des enzymes produites par les bactéries comme les β -lactamases (Fux *et al.*, 2005; Lewis, 2001). 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 (Del Pozo & Patel, 2007; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2010; Stewart, 2002; Tenke *et al.*, 2006; Zheng & Stewart, 2002). Ainsi, d'autres mécanismes de résistance doivent intervenir.

b) La croissance ralentie des bactéries

Il existe un gradient de sensibilité aux antibiotiques de haut en bas du biofilm (Fux *et al.*, 2005). 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

(Bridier *et al.*, 2011). 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 (Del Pozo & Patel, 2007).

c) 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 (Del Pozo & Patel, 2007). 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 (Adams & McLean, 1999; Collet *et al.*, 2008). Les modifications phénotypiques peuvent aussi toucher les cibles habituelles des bactéries planctoniques, comme la paroi bactérienne, diminuant ainsi l'efficacité des antibiotiques (Tenke *et al.*, 2006). 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 (Bridier *et al.*, 2011).

d) La persistance de bactéries

Une dose croissante d'antibiotique entraîne une décroissance initiale du nombre de bactéries vivantes dans un biofilm, jusqu'à un seuil au-delà duquel l'augmentation des doses n'augmente plus le nombre de bactéries tuées, car une population de bactéries persiste quelle que soit la dose administrée (Lewis, 2001). Ce taux de bactéries persistantes serait plus important dans les biofilms que chez les bactéries planctoniques (Stewart, 2002), notamment en profondeur du biofilm (Del Pozo & Patel, 2007).

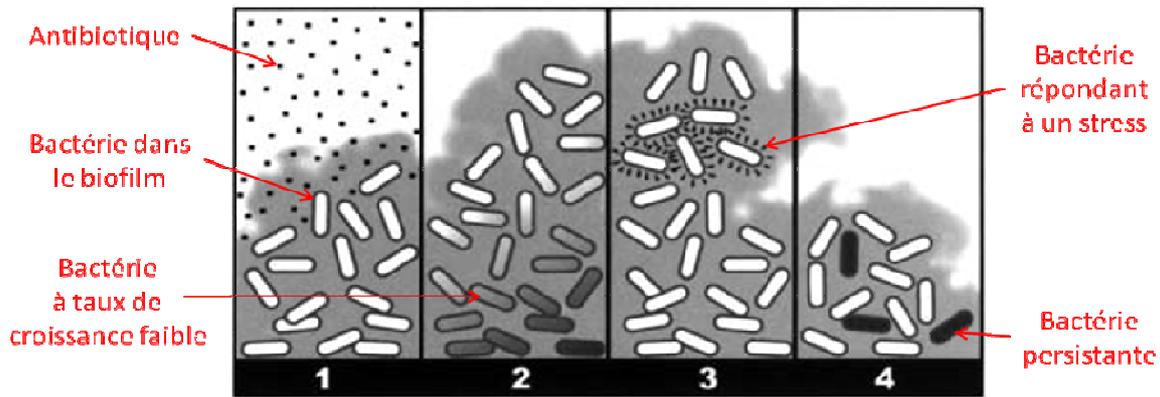


Figure 4 : Hypothèses de mécanismes de résistance des biofilms aux antibiotiques :

- 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).

II-2. Infections impliquant les biofilms

Au niveau médical, la formation de biofilm est reconnue comme responsable du développement ou de l'exacerbation de nombreuses infections chroniques, telles que les parodontites, les infections sur matériel médical, les pneumonies chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections chroniques du tractus urinaire (UTI), les otites moyennes chroniques, les prostatites chroniques ... (Donlan & Costerton, 2002; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009). La croissance des biofilms est lente et les premiers signes cliniques sont souvent longs à apparaître mais ils sont persistants. L'immunodépression et la présence d'un dispositif médical sont deux facteurs de risque importants de développement d'infections impliquant un biofilm. Les agents bactériens les plus souvent rencontrés appartiennent à la flore commensale de l'individu, comme *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *E. coli*.

Parsek et Singh ont proposé quatre critères pour définir une infection liée à un biofilm : la bactérie pathogène est associée à une surface, l'examen direct du tissu infecté montre un regroupement de bactéries au sein d'une matrice, l'infection est localisée et l'infection est résistante à un traitement antibiotique en dépit d'une sensibilité démontrée sur les mêmes bactéries planctoniques (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Parsek & Singh, 2003).

II-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 (Espinasse *et al.*, 2010; Guggenbichler *et al.*, 2011). Tout dispositif peut devenir le site d'une éventuelle infection : les sondes urinaires, les cathéters veineux centraux, les sondes endo-trachéales, 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 (Tenke *et al.*, 2006; Trautner & Darouiche, 2004a). 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 dominant largement le tableau des infections liées à la production de biofilm (tableau 1).

Tableau 1 : Fréquence relative des micro-organismes isolés dans les bactériémies nosocomiales à porte d'entrée potentiellement associée à un dispositif invasif dans un groupe d'établissements de santé (Espinasse *et al.*, 2010).

Porte d'entrée (nombre)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylocoque à coagulase négative	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Autres
Urinaire (n = 1 009)	7	3	52	15	6	17
Cathéter central (n = 549)	27	40	3	9	5	17
Cathéter veineux périphérique (n = 249)	37	33	4	12	4	10
Chambre à cathéter implantable (n = 229)	17	38	5	11	7	22
Pleuro-pulmonaire (n = 477)	22	9	9	18	14	28

II-3-1. Les infections associées au sondage urinaire

Les infections urinaires sont les infections nosocomiales les plus fréquentes (SFM, 2010a). Elles sont souvent associées à la réalisation d'un cathétérisme des voies urinaires. Les sondes urinaires sont des dispositifs médicaux utilisés pour :

- permettre l'évacuation des urines en cas de rétention aiguë,
- le drainage permanent en cas de rétention chronique ou incontinence,
- un but thérapeutique (lavage, instillation).

Elles sont mises en place dans la vessie par passage du méat urinaire et en suivant l'urètre, de façon atraumatique, indolore et en respectant des règles d'asepsie rigoureuses, puis sont reliées à un système constitué d'un tube de drainage, d'un sac collecteur d'urine, d'une valve anti-reflux et d'un site de prélèvement. Le système est dit « clos » lorsque le tube de drainage est fusionné avec le sac collecteur : il y a une fermeture complète du système d'évacuation urinaire. Ce type de système s'oppose au système « ouvert » qui n'est pratiquement plus utilisé aujourd'hui. Le sondage urinaire peut être unique (sondage itératif), répété (sondage intermittent plusieurs fois par jour) ou permanent (sondage à demeure).

L'utilisation d'une sonde urinaire est fréquente lors d'une hospitalisation (21 à 50 % des patients) (Jacobsen *et al.*, 2008). La complication majeure du sondage vésical est le développement d'infections du tractus urinaire (CAUTI pour Catheter-Associated Urinary Tract Infections). Le risque infectieux est lié à la méthode de sondage utilisée, à la durée du sondage, au type de sonde utilisé et au terrain du patient. Le risque est plus important en cas de sondage à demeure (SAD).

a) Les différents types de sondes urinaires

Une sonde urinaire est caractérisée par (Aulagner & Demoré, 2010):

- sa forme, droite ou béquillée,
- sa longueur (20 à 40 cm),
- sa charrière (CH), qui désigne le diamètre externe et qui correspond à 1/3 de mm, à choisir en fonction du calibre du méat urinaire qui varie de 3 à 8 mm,
- le matériau la constituant. Les différences de surface entre les matériaux influencent l'adhérence des micro-organismes :
 - Le latex : élastomère naturel hautement résistant et souple mais qui est irritant pour les muqueuses et peut être allergisant. Il présente des aspérités favorisant

l'adhérence. Les sondes en latex ne peuvent pas être maintenues plus de 7 jours et tendent à disparaître. L'enduction de silicone, d'hydrogel ou de Téflon (PTFE=PolyTétraFluoroEthylène) permet d'obtenir une meilleure tolérance et de limiter les incrustations en rendant la surface de la sonde plus lisse. Ces sondes peuvent être posées pendant 1 à 4 semaines.

- Le PVC (Polychlorure de Vinyl) : il est non irritant pour les muqueuses et présente une résistance moyenne à l'incrustation. Il est utilisé pour les sondages intermittents.
- La silicone : élastomère de synthèse qui présente une grande inertie chimique, une résistance à la chaleur et à l'incrustation. Les sondes en silicone sont bien tolérées et peuvent être posées 1 mois, mais leur coût est élevé.

Les sondes urinaires les plus couramment utilisées sont :

- les sondes de Mercier et de Nélaton qui sont des sondes vésicales sans système de fixation. Elles sont utilisées pour le sondage ponctuel ou le sondage intermittent, par exemple lors d'une hyperplasie de la prostate ou de la présence d'un obstacle comme des caillots ou des calculs, ou pour des instillations vésicales de médicaments.
- la sonde de Foley qui est une sonde à deux voies, avec un ballonnet gonflé à l'intérieur de la vessie pour permettre la fixation de la sonde. Elle est notamment utilisée pour le sondage à demeure.

b) Définition de l'infection du tractus urinaire

Une infection du tractus urinaire associée (SFM, 2010a) :

- la présence d'au moins un des signes suivants : fièvre ($>38^{\circ}\text{C}$), impériosité mictionnelle, pollakiurie, brûlure mictionnelle ou douleur sus-pubienne, en l'absence d'autre cause infectieuse ou non.
- et le critère biologique suivant à l'ECBU (Examen CytoBactériologique des Urines) lors d'un sondage vésical ou autre abord de l'arbre urinaire en cours ou dans les 7 jours précédents : une bactériurie $\geq 10^5$ micro-organismes/mL avec au plus 2 micro-organismes différents. La leucocyturie n'est pas contributive en présence d'un sondage urinaire.

La colonisation correspond à la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes dans l'arbre urinaire sans manifestation clinique. Les concepts de bactériurie asymptomatique et de

colonisation correspondent à la même entité. Seul le terme de colonisation est désormais admis (SFM, 2010a). La colonisation est désormais exclue du champ des infections urinaires associées aux soins (CTINILS, 2007).

c) Physiopathologie de l'infection urinaire sur sonde

Le tractus urinaire est normalement stérile, à l'exception des derniers centimètres de l'urètre distal qui sont colonisés par les flores périnéales, digestives et génitales. Plusieurs mécanismes permettent de lutter contre l'envahissement de la vessie par les micro-organismes : la longueur de l'urètre, les caractéristiques physico-chimiques de l'urine tels que le pH et l'osmolarité, le flux mictionnel, les immunoglobulines urinaires, ... Le sondage urinaire provoque une rupture de cette barrière de protection par :

- une action mécanique érosive sur la muqueuse urothéliale,
- la perturbation du flux mictionnel avec la présence quasi-constante de résidus,
- le développement d'un film muqueux constitué de protéines de l'hôte sur toute la surface de la sonde, constituant des récepteurs permettant l'adhérence des bactéries et la formation de biofilm. Une étude a montré la présence de biofilm sur 44 des 50 sondes posées pendant 3 à 83 jours (Ganderton *et al.*, 1992).

En présence d'une sonde urinaire, les micro-organismes requièrent donc moins de facteurs de virulence pour coloniser et établir une infection du tractus urinaire que ceux infectant un tractus urinaire fonctionnel (Jacobsen *et al.*, 2008).

En dehors des rares acquisitions par voie hématogène, deux modes d'entrée des bactéries par voie ascendante ont été décrits, qui peuvent s'associer chez un même patient sondé (figure 5) :

- la voie extraluminale : des bactéries endogènes peuvent être introduites directement lors de la mise en place de la sonde ou migrer du méat urinaire vers la vessie, le long du film muqueux développé sur la surface de la sonde. Cette voie est le mode d'entrée majoritaire des bactéries au cours des CAUTIs (66 %) (Jacobsen *et al.*, 2008).
- la voie endoluminale : des bactéries exogènes peuvent pénétrer à l'intérieur de la lumière de la sonde par contamination du système de drainage, notamment lors de la manipulation de la connexion sonde-collecteur d'urine, ou par contamination du sac collecteur avec reflux des urines collectés vers la vessie par exemple au moment de la mobilisation du patient. Ces bactéries exogènes sont véhiculées par le personnel de santé et peuvent diffuser selon un mode épidémique. Cette voie est désormais réduite grâce à l'utilisation quasi-constante de systèmes clos.

Ainsi, les sondages urinaires de longue durée entraînent une colonisation quasi-permanente des urines, avec la formation de biofilm sur la surface interne et externe de la sonde. L'épaisseur des biofilms formés sur des sondes de Foley en silicone, issues de patients sondés au long terme, a été mesurée à environ 200 μm , avec quelques cas de biofilm compris entre 200 et 500 μm . Il n'a pas été retrouvé de corrélation évidente entre l'épaisseur du biofilm et la durée du sondage (Donlan & Costerton, 2002). Cette colonisation peut être le point de départ d'infections urinaires nosocomiales chez 10 % des patients sondés (Espinasse *et al.*, 2010). L'infection du tractus urinaire peut être limitée à la vessie (cystite) ou se compliquer d'une atteinte rénale (pyélonéphrite), caractérisée par la survenue de fièvre et de douleurs lombaires, avec un risque à court terme de bactériémie ou de choc septique.

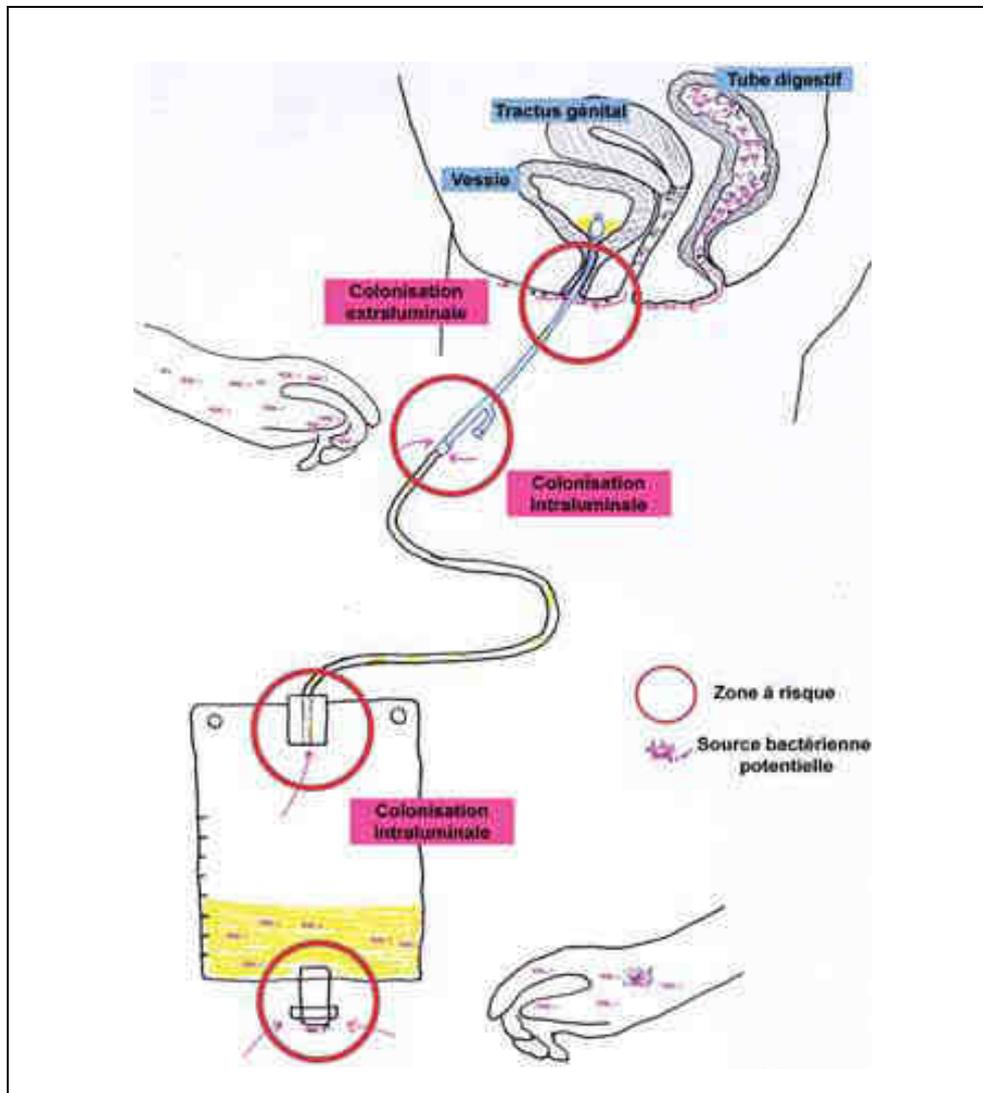


Figure 5 : Principales voies d'acquisition des micro-organismes lors d'un sondage vésical (Espinasse *et al.*, 2010).

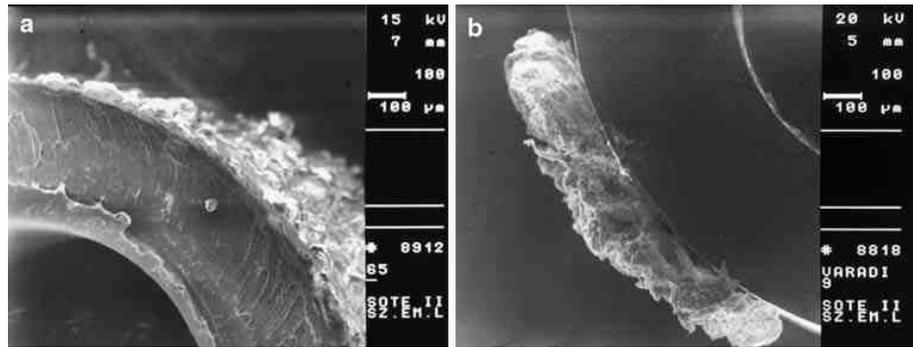


Figure 6 : Développement de biofilms bactériens sur une sonde urinaire observés par microscopie électronique (Tenke *et al.*, 2006).

d) Epidémiologie

Les données épidémiologiques disponibles peuvent se heurter au problème de l'absence de distinction entre la colonisation et l'infection urinaire, par manque de renseignements cliniques. Néanmoins, il ressort que 30 % des infections nosocomiales sont des infections urinaires, ce qui leur confère la première place chez les patients adultes hospitalisés en soins de suite et de réadaptation, soins de longue durée, médecine et obstétrique, ainsi que la deuxième place dans les services de réanimation et de chirurgie (Espinasse *et al.*, 2010). Les infections urinaires liées au sondage vésical (CAUTIs) représentent 80 % des infections urinaires nosocomiales (Jacobsen *et al.*, 2008). L'incidence d'acquisition d'une infection urinaire sur sonde varie de 3 à 10 % par jour de sondage, avec un risque cumulé de 100 % après 30 jours (SPILF & AFU, 2002; Trautner & Darouiche, 2004b). Bien que la mortalité et la morbidité des CAUTIs soient faibles, la prévalence élevée du sondage vésical induit un nombre absolu élevé de CAUTIs, qui peuvent avoir des conséquences importantes au niveau collectif (réservoir massif de bactéries hospitalières plus fréquemment résistantes aux antibiotiques, surcoût lié aux frais d'hospitalisation prolongée, du traitement, d'examens de laboratoire,...) mais aussi pour le patient (facteur de comorbidité) (Espinasse *et al.*, 2010).

Les souches de *E. coli* uropathogènes sont les micro-organismes les plus isolés dans les infections communautaires du tractus urinaire (70 à 90 %) ainsi que dans les infections du tractus urinaire associées aux soins (50 %), incluant les CAUTIs (25 %) (Jacobsen *et al.*, 2008; SFM, 2010a). Les autres entérobactéries (*Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., ...), *P. aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *S.aureus* et *Candida* sp. occupent également une place

non négligeable dans les CAUTIs (SFM, 2010a) (Tableau 2). La fréquence des souches résistantes aux antibiotiques est plus élevée dans les infections associées aux soins que dans les infections communautaires, constituant un véritable réservoir intra-hospitalier. Les CAUTIs survenant après un sondage de courte durée sont le plus souvent mono-microbiennes. Lors des sondages de longue durée (> 30 jours), il existe une bactériurie élevée ($\geq 10^5$ UFC/mL) et poly-microbienne (2 à 5 espèces) dans 80 % des cas. Ainsi, de nombreux biofilms sont constitués de plusieurs espèces bactériennes. Les espèces les plus couramment retrouvées dans ces biofilms hétérogènes sont *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* (Stickler, 2008). Cependant, la présence de biofilm peut fausser les résultats microbiologiques, qui ne reflètent que les bactéries libres dans les urines au moment du prélèvement (Trautner & Darouiche, 2004b).

Tableau 2 : Principaux micro-organismes isolés dans les infections urinaires (SFM, 2010a).

Espèces	Infections urinaires communautaires		Infections urinaires associées aux soins		Total %
	Femmes de 15 à 65 ans	Tous patients	Cathéter urinaire **		
	%	Données cumulées	Non (%)	Oui (%)	
<i>Escherichia coli</i>	75-80	66-75	40	25	31
<i>Proteus spp.</i>	4-5	4-6	7	7	7
<i>Klebsiella spp.</i>	2-3	4-5	10	10	10
<i>Enterobacter spp.</i>	1	1-2	2,5	5	4
<i>Citrobacter spp.</i>	1-2	1-2	2,5	3	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5	0,5-3	4	10	8
<i>Acinetobacter spp.</i>	0,1	0,2	<1	1	<1
<i>Enterococcus spp.</i>	2-4	3-8	16	13	14
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2-4	2-3	2,5	-	<1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	0,5-1	3	4	3,5
<i>Staphylococcus saprophyticus*</i>	1-4*	2	<1	<1	<1
Autres staphylocoques à coagulase négative	1	2	3	2	2
<i>Candida spp.</i>	<0,5	2	7	16	13

* *S. saprophyticus* peut dépasser 10 % des isolats chez les femmes de 15 à 20 ans.
 ** Cathétérisme urinaire de courte durée (< 30 jours) dans plus de 90 % des cas.

e) Traitement

La colonisation urinaire n'est pas une indication au traitement systématique par antibiotiques. Leur utilisation dans ce contexte ne permet pas de diminuer le risque de survenue d'épisodes

symptomatiques mais risque de promouvoir l'apparition de résistance bactérienne (Nicolle, 2005; Trautner & Darouiche, 2004b). Cependant, le traitement d'une colonisation d'une sonde urinaire peut être justifié dans certains cas particuliers : les patients neutropéniques ou immunodéprimés, les femmes enceintes et les patients en pré-opératoire lors d'une chirurgie ou d'explorations urologiques (SPILF & AFU, 2002; Trautner & Darouiche, 2004b).

En revanche, toutes les infections du tractus urinaire justifient un traitement, dont le choix est basé sur la nature du (ou des) micro-organisme(s) et de sa (leur) sensibilité aux antibiotiques. Les bactéries associées aux biofilms étant moins sensibles aux antibiotiques, il y a un risque de récurrence de l'infection (Muzzi-Bjornson & Macera, 2011) : il faut retirer la sonde urinaire, ou la changer lorsque le drainage est indispensable.

f) Prévention

Plusieurs mesures préventives sont indispensables :

- Eviter le sondage vésical abusif :

Les indications et la durée du sondage doivent être limitées au strict nécessaire. Des études sur la justesse de l'utilisation des sondages urinaires ont indiqué que 21 à 38 % des sondages étaient non justifiés (Trautner & Darouiche, 2004b). Des alternatives au sondage à demeure comme l'étui pénien, le cathéter sus-pubien ou le sondage évacuateur sont associées à un taux d'infections urinaires plus faible, elles sont donc à privilégier lorsque cela est possible. L'échographie sus-pubienne est préférable au sondage pour mesurer le résidu vésical.

- Utiliser un système «clos» :

Les systèmes clos permettent de réduire considérablement la bactériurie : elle est présente dans 95 % des cas après 96 heures de sondage avec un système ouvert, alors qu'elle est présente dans 50 % des cas après 14 jours de sondage chez l'homme et 11 jours chez la femme avec un système clos (Trautner & Darouiche, 2004b).

- Appliquer les protocoles d'insertion et de maintenance des sondes :

La pose de la sonde doit être réalisée avec asepsie. Le personnel soignant doit se désinfecter les mains et mettre des gants avant toute manipulation du système. Pour éviter les reflux, le sac collecteur doit être en position basse, mais sans contact avec le sol, et être changé régulièrement avant qu'il ne soit trop rempli. Le changement systématique de la sonde vésicale n'est pas recommandé.

- **Le choix de la sonde :**

Une faible charrière et un ballonnet de volume inférieur à 10 mL semblent réduire les irritations et le risque d'infections urinaires lors du sondage à demeure. Après chirurgie urologique, il est cependant nécessaire de maintenir un diamètre élevé pour l'évacuation de caillots. Les sondes enduites de silicone ou d'hydrogel permettent de diminuer l'adhérence des bactéries.

D'autres moyens de prévention sont envisagés, comme la prise de canneberge. En effet, la consommation d'extraits de canneberge a été proposée pour prévenir les infections urinaires. Ce produit limiterait, par le fructose et les substances proanthocyanidiniques qu'il contient, l'adhérence des bactéries sur les cellules uro-épithéliales tapissant la muqueuse vésicale (Lavigne *et al.*, 2008; Muzzi-Bjornson & Macera, 2011).

En revanche, certaines mesures ne sont pas recommandées :

- la présence d'antiseptique dans le sac collecteur,
- l'antibioprophylaxie,
- les irrigations ou instillations vésicales d'agents antimicrobiens.

II-3-2. Les infections associées aux cathéters vasculaires

La mise en place d'un dispositif intravasculaire peut répondre à plusieurs besoins :

- assurer un abord vasculaire pour l'administration de médicaments, de solutés de nutrition parentérale, de produits sanguins ;
- permettre la mesure des paramètres hémodynamiques.

En France, 110000 chambres implantables, 1 million de cathéters veineux et artériels centraux et 25 à 30 millions de cathéters veineux périphériques seraient mis en place chaque année (Espinasse *et al.*, 2010).

a) Les différents types de cathéters vasculaires

On distingue les cathéters intravasculaires utilisés pour des courtes durées :

- les cathéters veineux périphériques, insérés au niveau de la veine de la main ou de l'avant-bras pour une durée très courte de 2 à 4 jours ;

- les cathéters artériels périphériques, insérés au niveau de l'artère radiale ou fémorale pour le monitoring des paramètres hydrodynamiques ou pour permettre un accès vasculaire pour des prélèvements répétés de gaz du sang ;
- les cathéters veineux centraux, insérés dans des conditions d'asepsie chirurgicale dans la veine sous-clavière, jugulaire interne ou fémorale.

Et les cathéters intravasculaires utilisés pour de longues durées :

- les chambres à cathéter implantable, insérées chirurgicalement pour un traitement répété de plus de 3 mois ou veinotoxique ou en l'absence de capital veineux.

Les biomatériaux couramment utilisés pour former les cathéters vasculaires sont la silicone, le PTFE, le polyuréthane et le PVC. Le matériau utilisé influence le dépôt de protéines d'adhérence de l'hôte telles que l'albumine, le fibrinogène, la fibronectine,... et par conséquent l'attachement des bactéries et la formation de biofilm. Les cathéters vasculaires en silicone semblent plus à risque d'infections que ceux formés de PTFE, de polyuréthane ou de PVC (Zhang *et al.*, 2011).

b) Physiopathologie et épidémiologie

Quatre voies de colonisation des cathéters intravasculaires par des micro-organismes sont décrites (Trautner & Darouiche, 2004a; Zhang *et al.*, 2011) (figure 7):

- La voie extraluminale : les bactéries migrent à partir du site d'insertion et en suivant la surface externe du cathéter, le long du trajet sous-cutané. Les bactéries proviennent de la flore cutanée ou, moins fréquemment, de la flore oropharyngée du patient, de l'environnement hospitalier à partir des mains du personnel soignant ou d'un antiseptique contaminé. Cette porte d'entrée est moins importante pour les chambres implantables grâce à leur implantation dans une loge hermétique sous cutanée.
- La voie intraluminale : les bactéries migrent le long de la lumière du cathéter, à partir des connexions aux lignes de perfusion. Les bactéries proviennent alors également de la flore cutanée du patient ou des mains des personnels soignants.
- La voie hématogène : lors d'une bactériémie occasionnée par un foyer infectieux à distance, les bactéries présentes dans le sang peuvent s'attacher à la portion intravasculaire du cathéter. Elle est considérée comme rare (<10 %).
- L'administration d'une préparation injectable contaminée, rare également.

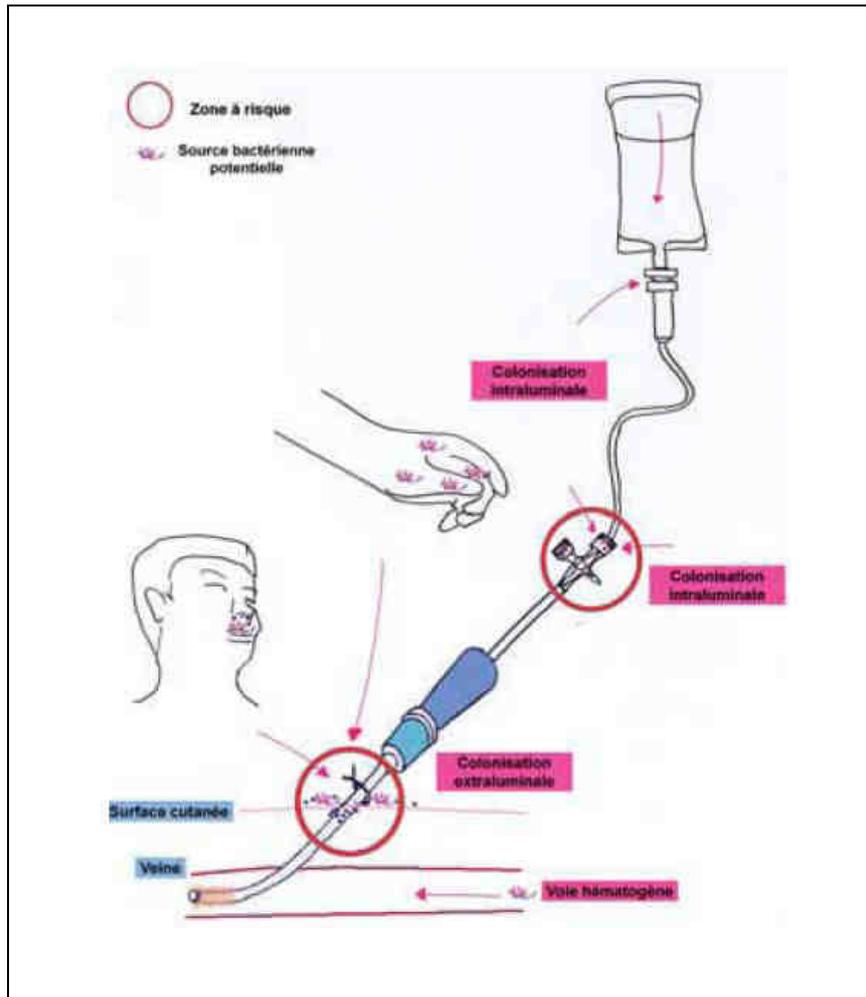


Figure 7 : Principales voies d'acquisition des micro-organismes en présence d'un cathéter vasculaire (Espinasse *et al.*, 2010).

Au contact du flux sanguin, la surface du cathéter se recouvre d'un film constitué d'éléments de l'hôte, comme des plaquettes ou des protéines (albumine, fibronectine, fibrinogène, ...), qui va favoriser la formation de biofilm (Donlan & Costerton, 2002). Le biofilm peut se former moins de 24 heures après l'insertion du cathéter (Trautner & Darouiche, 2004a). La formation de biofilm a tendance à être plus importante sur la surface externe pour le cathéter mis en place depuis moins de 10 jours. Pour ceux mis en place depuis plus de 30 jours, la formation de biofilm dans la lumière du cathéter semble prédominer (Donlan, 2011). Le risque infectieux varie selon le site d'insertion, l'immunocompétence du patient, la durée de pose et le type de cathéter (SFM, 2010b).

Pour les cathéters à émergence cutanée, les micro-organismes les plus fréquemment impliqués dans les bactériémies associées sont principalement ceux de la flore cutanée comme *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative, suivis de *Candida* sp. et des entérobactéries (Espinasse *et al.*, 2010).

Le diagnostic d'infection liée à un cathéter se fera à l'aide de prélèvement d'hémocultures différentielles et/ou de prélèvement de pus au niveau du site d'insertion et/ou de la culture du cathéter.

c) Prévention et traitement

Pour prévenir les infections liées aux dispositifs intravasculaires, il faut tout d'abord limiter les facteurs de risques. A côté des facteurs de risque liés au malade qui sont difficilement contrôlables, tels que les âges extrêmes ou l'immunodépression, d'autres facteurs ont été identifiés : les conditions de pose du cathéter et l'expérience de l'opérateur, le site d'insertion, le matériau du cathéter et son utilisation (durée de pose, fréquence et condition de manipulation de la ligne veineuse, type de soluté perfusé selon sa composition, son pH, son osmolarité). Quelques mesures sont essentielles (SFHH & HAS, 2005) :

- Restreindre la pose d'un cathéter vasculaire aux indications pertinentes et en limiter la durée par une réévaluation fréquente.
- Réaliser une désinfection des mains du personnel soignant avant la manipulation du cathéter par friction hydroalcoolique, ainsi qu'une antisepsie cutanée avant l'insertion du cathéter avec la Chlorhexidine alcoolique ou la polyvidone iodée alcoolique.
- Choisir un site d'insertion au membre supérieur plutôt qu'au membre inférieur chez l'adulte. Il est recommandé de ne pas insérer un cathéter en regard d'une articulation.
- Examiner le site d'insertion au moins une fois par jour à la recherche de signes locaux.

Une approche pour l'éradication des biofilms sur les cathéters intravasculaires est de réaliser un traitement intra-luminal du cathéter sous forme de « verrou antibiotique ». Une forte concentration d'agent antimicrobien est injectée *in situ* de façon à remplir la lumière du cathéter, pendant une durée suffisamment longue (≥ 12 h) pour éliminer le biofilm déjà formé. Il y a un risque potentiel de toxicité pour le patient en cas de diffusion de la solution injectée dans la circulation systémique (Donlan, 2011) mais aussi un risque de voir émerger des résistances aux agents anti-microbiens (Zhang *et al.*, 2011). Des résultats d'études animales et de modèles *in vitro* suggèrent que l'éradication des biofilms est possible par cette technique

e, dépendant du ou des micro-organismes en causes, de l'âge du biofilm, de l'agent antimicrobien utilisé et de la durée du traitement (Donlan, 2008). Diverses molécules ont été testées comme les associations héparine-vancomycine, héparine-vancomycine-ciprofloxacine, citrate-gentamicine, héparine-céfotaxime ou encore héparine-minocycline (Donlan, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer la concentration optimale en antibiotique à injecter dans ces verrous antibiotiques et évaluer leur effet (Donlan, 2011). Des essais cliniques réalisés chez des patients hémodialysés ont montré l'efficacité des verrous antibiotiques en prévention des bactériémies associées à la présence d'un cathéter (Snaterse *et al.*, 2010). Cependant, selon les recommandations de la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH), ces verrous antibiotiques ne sont pas recommandés dans la prévention des infections liées aux cathéters veineux périphériques (SFHH & HAS, 2005).

II-3-3. Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM)

Une PAVM correspond à « toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine, soit de manière invasive par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal ou d'une trachéotomie, soit de manière non invasive par l'intermédiaire d'un masque facial ou d'un autre procédé, dans les 48h précédant la survenue de l'infection » (CTINILS, 2007). L'association de différents critères radiologiques, biologiques et cliniques est impérative pour distinguer la PAVM de la colonisation trachéale.

Les pneumopathies associées aux soins représentent environ 15 % des infections nosocomiales. Leur incidence varie de 0,5 à 1 cas pour 100 admissions et augmente chez les patients sous ventilation mécanique (Espinasse *et al.*, 2010). Il s'agit de la première cause d'infection nosocomiale dans les services de réanimation.

a) Physiopathologie et épidémiologie

Les voies aériennes inférieures et les alvéoles pulmonaires sont normalement stériles grâce à plusieurs mécanismes de défense tels que les mouvements muco-ciliaires, les sécrétions locales d'immunoglobulines, l'activité macrophagique alvéolaire et le réflexe de toux (Guggenbichler *et al.*, 2011). L'invasion de micro-organismes provoque une pneumopathie. Le mécanisme majoritaire d'acquisition est la micro-inhalation de sécrétions contenant des

micro-organismes pathogènes, exogènes ou endogènes, qui ont colonisé les voies aériennes supérieures et digestives. La source principale de ces micro-organismes est l'oropharynx, mais la colonisation gastrique peut être favorisée par une augmentation du pH, la présence d'une sonde naso-gastrique ou la présence de reflux gastro-œsophagien. Les sondes endotrachéales favorisent l'accumulation de sécrétions en contournant les défenses naturelles de l'hôte : elles inhibent le réflexe de toux, compromettent la clairance muco-ciliaire, altèrent la surface épithéliale de la trachée et peuvent provoquer l'inoculation de bactéries oropharyngées vers les voies respiratoires inférieures (Gil-Perotin *et al.*, 2012; Guggenbichler *et al.*, 2011). Environ 8 à 28 % des patients sous ventilation mécanique pendant plus de 48 heures vont développer une PAVM (Guggenbichler *et al.*, 2011). Le risque de développer une PAVM est estimé à 3 % par jour de ventilation durant les 5 premiers jours, puis 2 % par jour entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jour (Espinasse *et al.*, 2010).

Les micro-organismes en cause varient en fonction du délai de survenue de la PAVM par rapport à l'intubation. Dans les PAVM précoces (< 5 jours), les bactéries habituellement retrouvées appartiennent à la flore commensale oropharyngée, surtout *Haemophilus influenzae* et *S. aureus* sensible à la méticilline mais aussi le Pneumocoque et *E. coli*. Elles sont dues à une inhalation lors de l'intubation et sont généralement moins sévères que les PAVM tardives (> 5 jours), dans lesquelles on retrouve une flore modifiée avec *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, des entérobactéries dont la sensibilité peut être modifiée par une antibiothérapie préalable à large spectre.

Dans une étude récente, la formation de biofilm en surface de sondes endotrachéales, découpées et vortexées, a été retrouvée dans 95 % des cas. De plus, en dépit d'un traitement adapté, l'échec thérapeutique semble plus fréquent lorsque la bactérie en cause dans la PAVM est retrouvée au sein du biofilm formé sur la sonde endotrachéale (Gil-Perotin *et al.*, 2012).

b) Prévention

Pour limiter l'exposition au risque, il faut privilégier la ventilation non invasive, réduire la durée de ventilation mécanique par des protocoles de sevrage et éviter les extubations non programmées et/ou réintubations.

II-3-4. Les infections ostéo-articulaires sur matériel (IOAM)

Les infections ostéo-articulaire sur matériel constituent l'une des complications les plus redoutées en chirurgie. Elles sont estimées entre 2000 et 2500 cas par an en France (HAS, 2005). Ces infections peuvent avoir des conséquences fonctionnelles importantes pour le patient, voire mettre en jeu le pronostic vital. Leur prise en charge doit faire l'objet de concertations pluridisciplinaires entre chirurgiens, infectiologues, microbiologistes, radiologues, anesthésistes et rééducateurs fonctionnels. Pour la prise en charge des IOAM les plus complexes, le Ministère de la Santé a reconnu 9 centres de référence interrégionaux (HAS, 2005). Le Centre de Référence pour la prise en charge des Infections Ostéo-Articulaires du Grand Ouest (CRIOGO) est le CHU de Tours.

Le matériel utilisé en chirurgie orthopédique peut être (SPILF, 2009) :

- du matériel d'ostéosynthèse, comprenant le matériel interne apposé à l'os ou situé en position centromédullaire (plaques, clous, vis, greffons, ligaments artificiels, ...) et les fixateurs externes ;
- des prothèses, considérées comme définitives. Leurs ablations ne peuvent être envisagées qu'au prix d'une dégradation fonctionnelle importante ;
- des substituts osseux et allogreffes.

a) Physiopathologie et épidémiologie

Les implants se recouvrent de protéines de l'hôte rapidement après leur pose, favorisant l'attachement des bactéries puis la formation de biofilm, à l'origine d'infections ostéo-articulaires sur matériel (Brady *et al.*, 2008). Un inoculum bactérien inférieur à 1 000 unités formant colonies est considéré comme suffisant pour déclencher le processus infectieux. Le biofilm s'étend en quelques heures à quelques jours à toute la surface du matériel, expliquant qu'un lavage chirurgical tardif au-delà de 15 jours soit inefficace. Ces constatations physiopathologiques expliquent la nécessité de l'ablation du matériel le plus souvent, surtout lorsque l'infection est ancienne, l'implant descellé ou l'état immun du patient défavorable. Les bactéries peuvent provenir :

- d'une contamination directe de l'extérieur :
 - lors d'un geste invasif : il s'agit d'infection sur site opératoire ou d'infection après un geste thérapeutique ou diagnostique ;

- post-traumatique : l'os et son matériel peuvent être exposés à l'air lors l'effraction cutanée provoquée par un agent vulnérant ou par une fracture ouverte, des escarres, des vascularites, des artérites, ... ;
- d'une contamination par contiguïté : l'infection des parties molles peut se propager aux structures ostéo-articulaires à proximité en suivant préférentiellement des territoires de drainage lymphatique ;
- d'une contamination par voie hématogène.

Les staphylocoques sont les bactéries le plus souvent isolées dans les infections sur matériel orthopédique. La fréquence des souches de staphylocoque à coagulase négative (particulièrement *S. epidermidis*) rejoint celle du *S. aureus*. Les infections sont le plus souvent mono-microbiennes (90 %). Parmi les autres bactéries isolées, les streptocoques (β -hémolytiques ou non hémolytiques), entérocoques, *P. aeruginosa*, les entérobactéries (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *P. mirabilis*) et les anaérobies (*Propionibacterium acnes*) sont à retenir. Il faut cependant souligner qu'en présence de matériel, n'importe quelle espèce bactérienne peut être impliquée, y compris *Brucella*, *Pasteurella*, *Listeria*, *Haemophilus*, *Campylobacter*, ... (SPILF, 2009).

b) Prévention

Les mesures générales de prévention des infections en chirurgie orthopédique et traumatologique sont :

- la préparation cutanée ;
- l'antibioprophylaxie par voie systémique, codifiée par la Conférence de consensus « antibioprophylaxie en milieu chirurgical chez l'adulte », actualisée en 1999 (SFAR, 1999) ;
- l'antibiothérapie locale à visée prophylactique sous forme de ciments imprégnés d'antibiotiques, qui est recommandée dans le cadre d'arthroplastie de première intention.

La mise en place de mesures préventives a réduit le risque d'infection per-opératoire à moins de 1 % pour les prothèses de hanche et à moins de 2 % pour les prothèses de genou (HAS, 2005).

II-4. 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.

II-4-1. 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 :

a) Les dispositifs imprégnés de substances hydrophiles

L'adhérence bactérienne dépend fortement des propriétés physicochimiques des matériaux constituant 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 (Francolini & Donelli, 2010).

b) Les dispositifs imprégnés d'argent ou de substances antimicrobiennes

L'argent limiterait l'attachement et la croissance des bactéries (Zhang *et al.*, 2011). Des analyses ont montré que ces systèmes seraient efficaces pour prévenir les bactériuries lors des sondages de courte durée. Le nitrofurane aurait les mêmes propriétés (Muzzi-Bjornson & Macera, 2011; Trautner & Darouiche, 2004b). 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 (Donlan & Costerton, 2002).

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 (Hachem *et al.*, 2009).

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 (Trautner & Darouiche, 2004a).

c) 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.

d) L'éthanol

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

II-4-2. 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.

a) 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 (Tenke *et al.*, 2006). Les molécules qui pénètrent bien dans le biofilm telles que les fluoroquinolones et la rifampicine sont plus efficaces (Donlan, 2011). 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 (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2007). 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 ralenti. Les macrolides ont montré leur efficacité dans la réduction des exopolysaccharides du biofilm : ils favorisent alors la pénétration des autres antibiotiques (Donlan, 2011). De nouvelles molécules comme le ceftobiprole, une céphalosporine de 4^{ème} génération, sont à l'étude (Simoès, 2011). Cependant, l'antibiothérapie reste trop peu souvent efficace et ne doit pas remplacer le retrait du dispositif lorsque cela est possible.

b) 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 (Del Pozo & Patel, 2007). 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 dépolymérase, alginate lyases, dispersin B ou DNase (Bridier *et al.*, 2011). Les biofilms étant souvent constitués de plusieurs espèces, des formulations contenant plusieurs enzymes semblent fondamentales pour une stratégie de contrôle efficace (Simoès, 2011). Certains bactériophages peuvent aussi produire des enzymes comme la polysaccharide dépolymérase qui peuvent dégrader la matrice des biofilms (Donlan, 2011).

c) 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 (Del Pozo & Patel, 2007).

d) 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 (Francolini & Donelli, 2010). 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 (Brackman *et al*, 2011.).

III. Le biofilm chez *Escherichia coli*

III-1. Rappels sur *E. coli* et son pouvoir pathogène

E. 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 *E. coli* sont de deux types : les infections intestinales et les infections extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies et méningites). Les méthodes d'analyse génomique ont montré que l'espèce *E. coli* pouvait être divisée en plusieurs groupes phylogénétiques, les principaux étant les groupes A, B1, B2 et D. Les souches commensales et celles responsables de diarrhées appartiennent majoritairement aux groupes A et B1, alors que celles responsables de pathologies extra-intestinales appartiennent majoritairement aux groupes B2 et D (Denis *et al.*, 2007a). La production d'une large variété de facteurs de virulence (adhésines, polysaccharides de surface, toxines, invasines, sidérophores, protéases,...) distingue les souches pathogènes des souches commensales (Johnson & Russo, 2002). Ils permettent à *E. coli* de coloniser la surface de diverses muqueuses de l'hôte, de lutter contre les mécanismes de défense de l'hôte, de capter des éléments nutritifs essentiels comme le fer, d'envahir les cellules et de stimuler une réaction inflammatoire (Johnson & Russo, 2002). Ces facteurs de virulence sont fréquemment codés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les bactériophages qui facilitent le transfert de l'information génétique entre les souches et la création de nouvelles combinaisons de facteurs de virulence (Dobrindt, 2005; Kaper *et al.*, 2004). Les îlots de pathogénicité sont de larges parties de génomes (10-200 kb) jouant un rôle majeur pour la transformation d'une souche avirulente en souche virulente. Ainsi, le génome de *E. coli* contient une partie conservée chez toutes les souches, codant pour les fonctions cellulaires essentielles, et une partie variable (Dobrindt *et al.*, 2010). La comparaison du génome de souches commensales et de souches pathogènes met en évidence des différences de taille et d'organisation, pouvant atteindre 1 million de paires de bases. L'acquisition de séquences nouvelles sur le chromosome ou sur des plasmides a permis l'apparition des différents pathotypes, définis comme étant un groupe de souches d'une même espèce provoquant une même maladie par l'utilisation de facteurs de virulences communs (Kaper *et al.*, 2004).

Un exemple récent de souche pathogène de *E. coli* est le sérotype de *E. coli* O104:H4, responsable d'une épidémie grave en Allemagne pendant les mois de Mai, Juin et Juillet 2011 qui a concerné 3816 personnes en Allemagne et entraîné 54 décès (Frank *et al.*, 2011). Cette souche aurait acquis plusieurs facteurs de virulence, augmentant sa capacité à envahir les cellules intestinales et lui permettant de produire une Shiga-toxine. Ces *E. coli* producteurs de shiga-toxines peuvent entraîner des manifestations cliniques variées (diarrhée banale ou sanglante) pouvant évoluer vers une complication grave, le syndrome hémolytique et urémique (SHU).

III-2. Déterminants de la formation de biofilm chez *E. coli*

Parmi les nombreux facteurs de virulence décrits chez *E. coli*, un certain nombre sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation du biofilm. 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 (Beloin *et al.*, 2008; Van Houdt & Michiels, 2005). Leurs voies de régulation sont complexes et peuvent être intriquées, rendant difficile la compréhension des conditions de formation des biofilms qui sont très dépendantes des conditions environnementales.

III-2-1. Les flagelles

Les flagelles sont des appendices filamenteux extracellulaires de structure hélicoïdale, insérés dans la membrane interne. Ils permettent à la bactérie de se déplacer en milieu liquide ou semi-liquide et ont un rôle dans le chimiotactisme. Une étude a montré le rôle décisif des flagelles dans l'initiation de la formation de biofilm : ils favoriseraient l'attachement initial des bactéries à une surface en luttant contre les forces électrostatiques répulsives et leur permettraient de se propager le long de cette surface (Pratt & Kolter, 1998). Cependant, certaines souches non mobiles sont également capables de produire du biofilm. C'est le cas des *E. coli* entéroagrégatifs (Sheikh *et al.*, 2001) ou de souches surexprimant des adhésines de surfaces telles que les curli (Prigent-Combaret *et al.*, 2000).

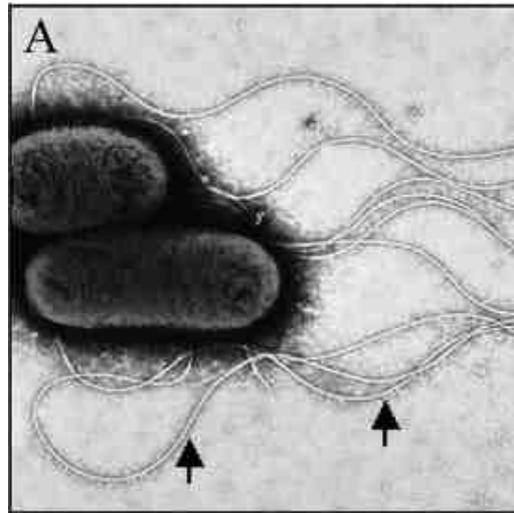


Figure 8 : Photographie par microscopie électronique de souches de *E. coli* exprimant des flagelles (au niveau des flèches) (Erdem *et al.*, 2007).

III-2-2. Les fimbriae (ou pili)

Les fimbriae sont des appendices filamenteux extracellulaires permettant aux bactéries d'adhérer entre elles ou à une surface. Ils forment des tubes minces et droits implantés dans la membrane externe bactérienne et constitués de plusieurs sous-unités. Ils sont plus courts, plus minces et plus nombreux que les flagelles. Il existe quatre classes principales de fimbriae : les fimbriae de type 1, les fimbriae P, les curli et les pili conjugatifs.

a) Les fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont des protéines d'adhérence, ou adhésines, exprimées à la surface de nombreuses entérobactéries, dont les souches commensales et pathogènes de *E. coli* (Le Bouguenec, 2005). C'est le facteur de virulence le plus fréquemment exprimé chez les souches de *E. coli* uropathogènes (80 à 100 % des souches) (Jacobsen *et al.*, 2008). Les fimbriae de type 1 ont une forme de tube mesurant approximativement 7 nm de large et 1 µm de long (Van Houdt & Michiels, 2005). Une bactérie en exprime généralement 200 à 500 à sa surface (Bergsten *et al.*, 2005).

L'opéron *fim* code pour les protéines de structure (FimA, FimI, FimF, FimG, et FimH), de synthèse et de régulation des fimbriae de type 1. La protéine adhésive FimH, située à l'extrémité des fimbriae de type 1, est responsable de la liaison à divers récepteurs présents en

surface des cellules eucaryotes : le mannose, les IgA sécrétoires, la laminine, le collagène ou la fibronectine (Bergsten *et al.*, 2005). Les fimbriae de type 1 permettent également l'attachement aux surfaces inertes comme le PVC, probablement en modifiant la structure de la membrane externe bactérienne (Beloin *et al.*, 2008; Pratt & Kolter, 1998). Ainsi, plusieurs études ont montré que les fimbriae de type 1 ont un rôle majeur dans l'attachement initial des souches de *E. coli* sur diverses surfaces (Beloin *et al.*, 2008; Van Houdt & Michiels, 2005).

L'expression des fimbriae est soumise à une variation de phase, qui correspond à une réorganisation génétique qui va « allumer » ou « éteindre » l'expression de différents gènes auxquels sont liés divers traits phénotypiques. Cette stratégie permet une adaptation rapide des bactéries aux variations de conditions environnementales (Filloux & Vallet, 2003). Cette variation de phase est catalysée par deux enzymes, FimE et FimB (Van Houdt & Michiels, 2005). L'expression des fimbriae de type 1 est induite par l'adhérence des bactéries et la formation de biofilm (Beloin *et al.*, 2008).

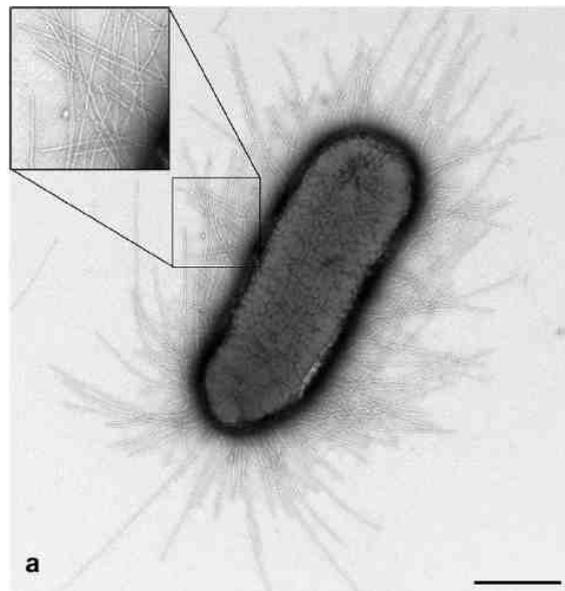


Figure 9 : Photographie par microscopie électronique d'une souche de *E. coli* productrice de fimbriae de type 1. Le trait correspond à 700 nm (Hahn *et al.*, 2002).

b) Les fimbriae P

Les fimbriae de type P sont les seconds facteurs de virulence associés aux souches de *E. coli* uropathogènes, notamment celles responsables de pyélonéphrites (Jacobsen *et al.*, 2008). L'opéron *pap* est impliqué dans la synthèse et l'assemblage de ces fimbriae P. Les protéines de structure sont : PapA, PapH, PapK, PapE, PapF, et PapG. La protéine adhésive est PapG, qui reconnaît les digalactosides Gal α (1-4)Gal β présents dans les glycolipides des cellules épithéliales (Bergsten *et al.*, 2005).

c) Les curli

Les curli sont des fibres protéiques très fines s'agréant entre elles à la surface des bactéries pour former une structure de 6 à 12 nm de diamètre et de 0,5 à 1 μ m de long (Beloin *et al.*, 2008). Ils sont capables de se fixer à des protéines de la matrice extra-cellulaire comme la fibronectine, la laminine et le plasminogène, permettant l'adhérence des bactéries à différents type de cellules humaines. Ils faciliteraient également l'attachement initial sur des surfaces inertes (Beloin *et al.*, 2008). Les curli permettent aux bactéries de s'agréer entre elles et de former des amas : cette propriété est utilisée dans l'étape initiale de développement du biofilm. Ils seraient aussi inducteurs de la réponse inflammatoire de l'hôte (Barnhart & Chapman, 2006).

Les gènes impliqués dans la synthèse des curli sont situés sur les opérons *csgBAC* et *csgDEFG*, transcrits de façon opposée. La protéine CsgA, appelée curline, constitue la sous-unité majoritaire des curli. La protéine CsgB forme la sous-unité mineure, localisée à la surface de la bactérie. Elle intervient dans la polymérisation des monomères de CsgA en curli. La protéine CsgD est un régulateur transcriptionnel essentiel à la transcription de l'opéron *csgBAC*. Les produits des gènes *csgEFG* seraient impliqués dans la sécrétion et l'assemblage des curli. Bien que ces opérons soient très conservés parmi les souches de *E. coli*, certaines souches de laboratoire ne produisent plus de curli en raison de l'absence d'expression du promoteur de *csgD* qui est affectée par divers régulateurs transcriptionnels comme RpoS, IHF, H-NS, OmpR et CpxR (Barnhart & Chapman, 2006; Van Houdt & Michiels, 2005). La synthèse des curli est donc sous l'influence d'une régulation complexe, dépendant notamment de la température, l'osmolarité, le pH et l'oxygénation du milieu (Beloin *et al.*, 2008).

Les curli ont été décrits initialement chez *E. coli* mais sont aussi présents dans d'autres espèces d'entérobactéries (*Shigella* sp., *Citrobacter* sp. et *Enterobacter* sp.) (Beloin *et al.*,

2008). Parmi les souches de *E. coli*, les curli sont exprimés chez la plupart des souches entérohémorragiques et entérotoxigènes mais absents des souches entéroinvasives et entéro-pathogènes (Van Houdt & Michiels, 2005).

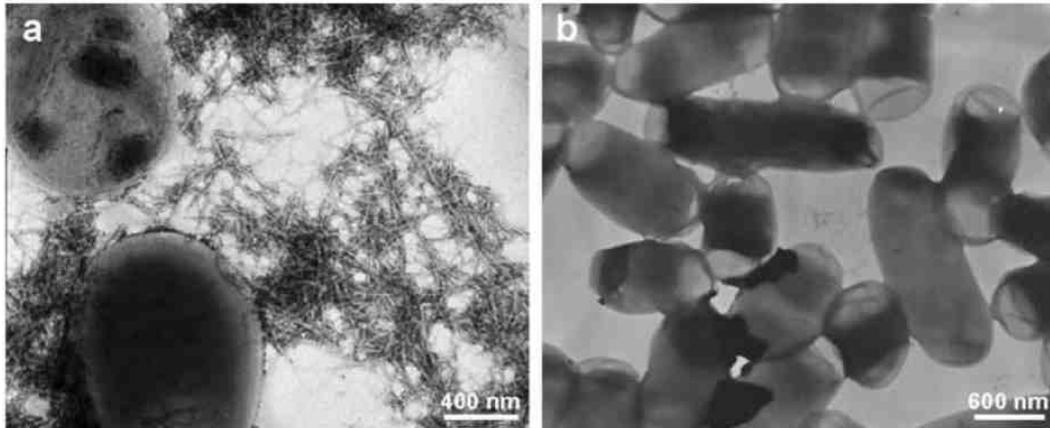


Figure 10 : Photographie par microscopie électronique de a) une souche productrice de curli et b) une souche non productrice de curli (Barnhart & Chapman, 2006).

d) Les pili conjugatifs

Les pili conjugatifs permettent la conjugaison bactérienne. C'est un processus de transfert horizontal de gènes nécessitant un contact étroit entre deux cellules, au cours duquel un plasmide conjugatif est transmis d'une cellule donneuse à une cellule receveuse, grâce à un pili conjugatif codé par ce plasmide. Ces échanges de gènes seraient favorisés au sein des biofilms. De plus, les plasmides conjugatifs exprimeraient des facteurs impliqués dans l'initiation et la formation de l'architecture du biofilm (Beloin *et al.*, 2008; Ghigo, 2001). Ainsi, les souches de *E. coli* portant un plasmide conjugatif produiraient un épais biofilm (Beloin *et al.*, 2008).

III-2-3. Les auto-transporteurs de type V

Chez les bactéries à Gram négatif, la translocation des protéines vers la surface bactérienne ou le milieu extracellulaire nécessite le passage à travers la membrane cytoplasmique, le périplasme et la membrane externe. Le passage de la membrane externe est réalisé grâce à différentes voies de sécrétion. Parmi elles, les auto-transporteurs de type V sont des protéines sécrétées qui contiennent tout l'équipement nécessaire pour leur propre sécrétion à travers la

membrane externe. Ces protéines ont une structure similaire avec quatre domaines caractéristiques : un peptide signal N-terminal permettant le passage de la membrane cytoplasmique par la voie Sec-dépendante, le domaine constituant la protéine mature qui est sécrétée (ou domaine passager), une région nécessaire au passage du domaine passager à travers la membrane externe et un domaine C-terminal formant un pore transmembranaire (Henderson *et al.*, 2004). Après le passage de la membrane cytoplasmique, le peptide signal est coupé par une peptidase, libérant la protéine mature dans l'espace périplasmique. Le domaine C-terminal peut alors s'insérer dans la membrane externe pour former un pore transmembranaire permettant la translocation du domaine passager à la surface bactérienne (Beloin *et al.*, 2008). Parmi ces auto-transporteurs, l'antigène 43 et les protéines AidA et TibA ont un rôle dans la formation des biofilms.

a) L'antigène 43 (Ag43)

L'Ag43 est une protéine de surface présente chez la plupart des souches de *E. coli* commensales et pathogènes. Cet auto-transporteur est une adhésine qui possède des récepteurs pour lier un autre Ag43 présent sur une autre bactérie. Ainsi, l'Ag43 permet l'agrégation des bactéries entre elles et donc la formation de micro-colonies. Il aurait un rôle dans le développement tri-dimensionnel des biofilms (Beloin *et al.*, 2008). De plus, l'expression du gène *flu*, codant pour l'Ag43, est souvent augmentée chez les bactéries organisées en biofilm par rapport aux bactéries planctoniques (Beloin *et al.*, 2008). Les interactions Ag43-Ag43 peuvent être bloquées en présence de polysaccharides capsulaires (Van Houdt & Michiels, 2005).

b) Les Protéines AidA et TibA

AidA (Adhesin involved in diffuse Adherence) est une protéine de surface glycosylée produite par les souches de *E. coli* responsables de diarrhée. Elle est associée à une adhérence aux cellules humaines. TibA est aussi une protéine de surface glycosylée présente chez les souches de *E. coli* entérotoxigène, associée à une adhérence aux cellules épithéliales et à leur invasion. Ce sont des protéines favorisant l'auto-agrégation des bactéries et la formation de biofilm (Beloin *et al.*, 2008; Van Houdt & Michiels, 2005).

III-2-4. Les polysaccharides de la matrice du biofilm

En parallèle de l'expression de protéines adhésives, la production d'une matrice est essentielle pour la maturation du biofilm. Comme il a été vu précédemment, elle a un rôle protecteur et structural. Les interactions entre les différents constituants de la matrice peuvent participer à la croissance tri-dimensionnelle du biofilm. Il existe une très grande hétérogénéité dans la composition de la matrice, mais plusieurs exopolysaccharides tels que la cellulose, l'acide colanique ou le PGA sont des composants clés des biofilms à *E. coli*.

a) Le Poly- β -1,6-N-acétyl-glucosamine (PGA)

L'implication du PGA dans la formation des biofilms est bien connue chez les staphylocoques, et n'a été découverte que plus récemment chez *E. coli*. Le PGA est un polymère polysaccharidique impliqué dans l'attachement aux surfaces, dans l'adhérence entre les bactéries et dans la structuration du biofilm. Une étude sur la dépolymérisation du PGA par un traitement spécifique a conduit à un déséquilibre complet et à une dispersion du biofilm. L'opéron *pgaABCD* code pour des protéines impliquées dans la synthèse, l'export et la localisation des polymères de PGA (Beloin *et al.*, 2008).

b) La cellulose

La cellulose, principal composant de la paroi cellulaire végétale, est un homopolysaccharide. La production de cellulose par les bactéries est un phénomène largement répandu chez les entérobactéries, notamment chez les souches commensales et pathogènes de *E. coli*. Sa synthèse est dirigée par deux opérons, *bcsABZC* et *bcsEFG* (Beloin *et al.*, 2008). L'expression est, comme pour les curli, activée par le régulateur transcriptionnel CsgD (Saldana *et al.*, 2009). La cellulose serait impliquée dans la formation d'un biofilm rigide (Beloin *et al.*, 2008).

c) L'acide colanique

L'acide colanique est un polysaccharide produit par *E. coli* et les autres entérobactéries. C'est un polymère de glucose, galactose, fucose et d'acide glucuronique formant une capsule protectrice autour de la bactérie sous certaines conditions environnementales. L'acide colanique a une structure et une voie d'assemblage très proche de celle de la capsule et est souvent classée dans cette catégorie. Cependant, à la différence des capsules, une quantité

significative d'acide colanique produit est aussi libérée dans le milieu extracellulaire. Les gènes nécessaires à sa synthèse sont groupés sur l'opéron *wca*, anciennement appelé *cps*. Sa synthèse est induite par le système à trois composants RcsC/RcsD/RcsB. Rcs semble répondre à certaines conditions environnementales comme la dessiccation, un stress osmotique et la croissance sur une surface solide (Beloin *et al.*, 2008). Des expériences sur des souches de *E. coli* mutantes déficientes en acide colanique ont montré qu'il n'est pas nécessaire à l'attachement sur une surface solide mais est important pour l'établissement de la structure tridimensionnelle du biofilm, dans les dernières étapes de sa formation. RcsC stimulerait les gènes impliqués dans la formation des polysaccharides et inhiberait les gènes codant pour les fimbriae et l'antigène 43 (Van Houdt & Michiels, 2005).

III-2-5. Les polysaccharides à la surface bactérienne

Les polysaccharides de surface ont aussi un rôle dans les interactions entre les bactéries et leur environnement. La plupart des souches de *E. coli* produisent un nombre complexe de polysaccharides de surface, spécifiques de sérotypes : le lipopolysaccharide (LPS) avec l'antigène O et l'antigène de capsule K. Les variations de structure de ces polysaccharides donnent plus de 170 antigènes O et 80 antigènes K différents, définissant différents sérogroupes de *E. coli* (Beloin *et al.*, 2008).

a) Le Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, aussi appelé endotoxine, est un polymère glycolipidique présent de manière constitutive dans la membrane externe et dépassant en surface de toutes les bactéries à Gram négatif. Plus de 50 gènes sont requis pour la synthèse du LPS et son assemblage à la surface bactérienne. Au niveau structural, les LPS sont constitués d'un lipide A, qui est le composant toxique, et d'une fraction polysaccharidique constituant l'antigène O, responsable de la spécificité antigénique O permettant de décrire différents sérogroupes. Le lipide A n'est libéré, de manière massive, qu'après la lyse de la bactérie. La libération d'endotoxine dans la circulation sanguine, notamment à la suite d'une bactériémie, peut conduire à un choc endotoxinique et au décès. Concernant la formation de biofilm, des mutations affectant la formation de LPS semblent affecter la capacité de ces souches de *E. coli* à adhérer aux surfaces inertes et diminuer la formation de biofilm. Cet effet serait peut-être indirect, par une action sur l'expression des fimbriae de type 1 et d'acide colanique. En revanche, la

diminution d'expression de LPS pourrait aussi démasquer d'autres adhésines et donc favoriser l'attachement initial des bactéries (Beloin *et al.*, 2008).

b) La capsule

La capsule polysaccharidique est une enveloppe protectrice qui entoure la paroi bactérienne. Chez *E. coli*, elle définit 80 sérotypes capsulaires différents. La capsule semble aussi jouer un rôle dans la formation des biofilms : elle pourrait diminuer les contacts entre les bactéries et les surfaces et les contacts entre les bactéries, diminuant la formation de biofilm (Beloin *et al.*, 2008).

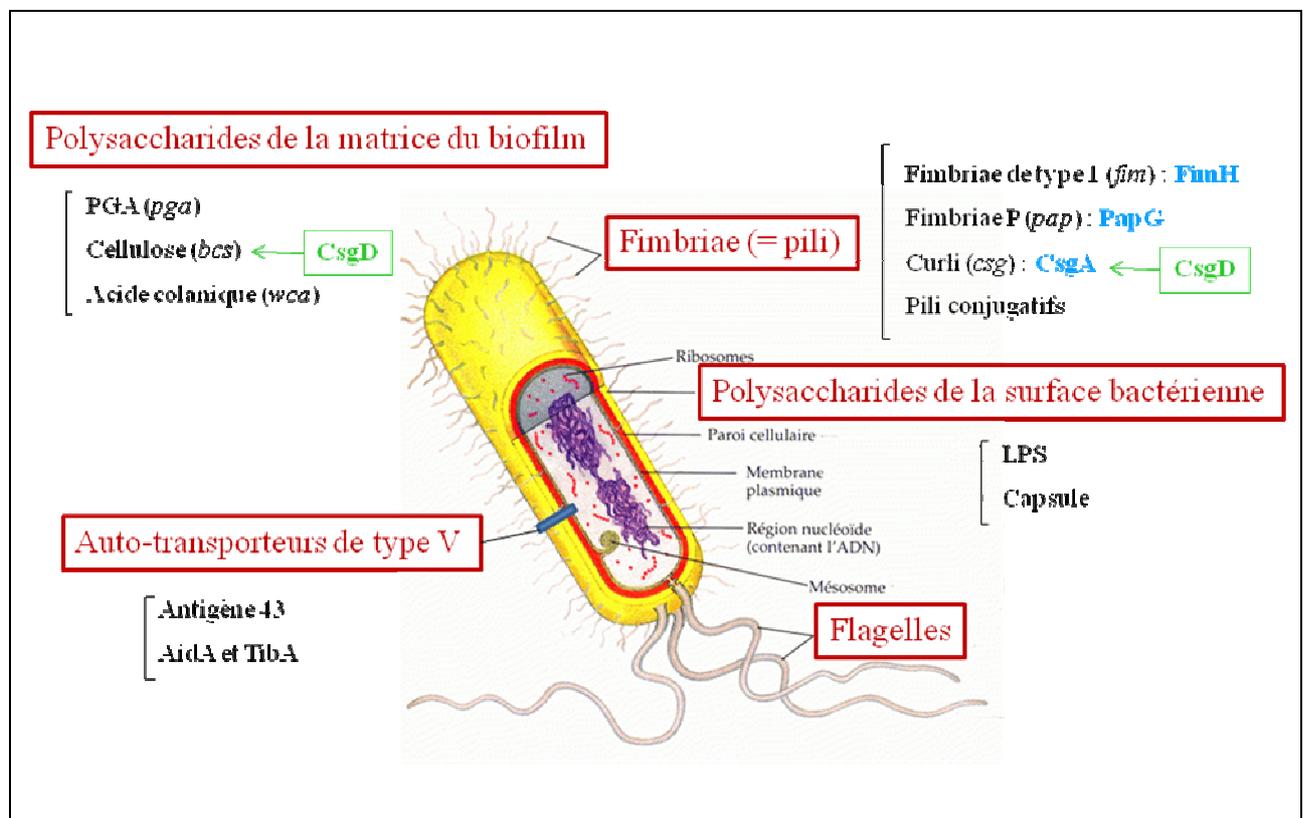


Figure 11 : Représentation schématique des principaux déterminants de la formation de biofilm chez *E. coli*

(en italique : les opérons responsables de la synthèse des déterminants ; en bleu : les protéines responsables de l'adhérence ; en vert : les protéines de régulation).

III-3. Comparaison avec d'autres micro-organismes d'intérêt médical

La formation de biofilm a probablement été plus étudiée chez *P. aeruginosa* et chez les staphylocoques, notamment *S. aureus* et *S. epidermidis*. Tous les biofilms sont composés d'une matrice extracellulaire qui relie les bactéries. Cependant, la composition des biofilms est variable et les mécanismes moléculaires qui régulent leur formation varient selon les espèces.

III-3-1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. 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 (Denis *et al.*, 2007b). Les infections chroniques se caractérisent par la formation d'un biofilm bactérien.

Les déterminants essentiels à l'approche et à la colonisation d'une surface chez *P. aeruginosa* sont les flagelles et les pili de type IV (structure fibrillaire en surface des bactéries permettant plus particulièrement des mouvements à l'interface de surfaces solides, basés sur la capacité de rétraction de ces pili). Les souches muqueuses de *P. aeruginosa*, souvent rencontrées lors d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose, produisent de l'alginate qui est un exopolysaccharide. L'expression d'alginate est augmentée d'un facteur quatre lors de la formation de biofilm. Cette couche d'alginate a un rôle dans la structure du biofilm et un rôle protecteur. De plus, comme *E. coli*, *P. aeruginosa* produit du lipopolysaccharide (LPS) (Filloux & Vallet, 2003).

III-3-2. Staphylocoques

Les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* sont des commensaux de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux. Elles peuvent être responsables d'infections cutanées ou muqueuses, de bactériémies et d'infections diverses (osseuses, pleuropulmonaires, urogénitales, neuroméningées ou cardiaques). *S. epidermidis* et *S. aureus* sont les agents les plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales et d'infections sur les dispositifs médicaux, qui impliquent la formation de biofilm.

L'attachement aux cellules humaines se fait grâce à des protéines ancrées dans la paroi bactérienne, appelées MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) et à une autolysine nommée AtlA chez *S. aureus* et AtlE chez *S. epidermidis*. Ensuite, la principale molécule responsable de l'adhérence entre les bactéries est un polysaccharide, le PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), également appelée PNAG (Polymer of N-Acetyl Glucosamine), et codée par l'opéron *ica* (Otto, 2008).

III-3-3. *Candida albicans*

C. albicans est une levure commensale du tube digestif et des muqueuses génitales de l'Homme et des animaux. Pathogène opportuniste, il peut être responsable de pathologies variées allant de l'infection de la peau et des muqueuses à des infections systémiques de pronostic redoutable et le plus souvent nosocomiales. Ces candidoses sont généralement associées à la présence de dispositifs médicaux, comme les cathéters vasculaires ou les valves cardiaques, avec développement de biofilm à leur surface (Nett & Andes, 2006).

Les étapes de formation des biofilms sont similaires à celles d'un biofilm bactérien. Toutefois, lors de la phase de colonisation, une modification morphologique est observable, caractérisée par l'apparition de filaments (ou hyphes). Le biofilm mature est donc composé de spores et de formes filamenteuses qui sont intégrés dans une matrice polysaccharidique (Nett *et al.*, 2009). L'ensemble de gènes ALS (Agglutinin-Like Sequence) code pour des adhésines Als impliquées dans l'adhérence des *Candida* sp. à une surface et dans la formation précoce du biofilm (Nett *et al.*, 2009).

IV. Méthodes d'étude *in vitro* des biofilms

Les problèmes de Santé publique provoqués par les biofilms sont maintenant clairement définis. Pour prévenir et lutter contre ces biofilms, une meilleure compréhension de leurs mécanismes de formation est nécessaire. De nombreuses méthodes d'étude de la formation et du développement des biofilms ont été utilisées au cours des dernières années : des méthodes d'observation par microscopie (microscope à fluorescence, microscope confocal à balayage laser, microscope électronique à balayage) ou des méthodes de numération des bactéries après détachement des biofilms par sonication, frottement ou vortex des surfaces. Ces techniques permettent d'obtenir des informations détaillées mais sont difficiles et longues à réaliser. C'est pourquoi des modèles d'étude *in vitro* en microplaques ont été développés. Ces tests ont l'avantage d'être relativement rapides et peu coûteux. Ils permettent de réaliser de nombreux tests simultanément, notamment pour tester l'effet de plusieurs facteurs influençant la formation de biofilm, comparer la capacité de formation de biofilm de souches sauvages et de souches mutantes, ou encore tester la sensibilité des bactéries au sein du biofilm aux agents antimicrobiens.

Après 24 à 48h de culture, un biofilm peut se former au fond de la microplaque. Des étapes de lavage éliminent les bactéries n'ayant pas adhéré, puis on peut observer et quantifier la formation de biofilm grâce à l'ajout d'un composé coloré ou fluorescent (figure 12). La détection du biofilm formé repose sur la mesure de la biomasse (quantification de la matrice et des bactéries vivantes ou non), de la viabilité (quantification des bactéries vivantes) ou de la matrice (quantification des composants spécifiques de la matrice) (Peeters *et al.*, 2008).

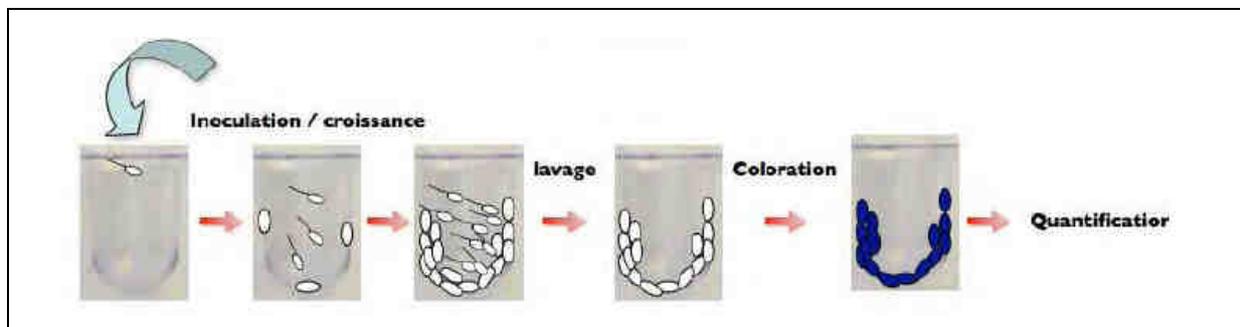


Figure 12 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques (Laurent, 2011).

Dans ces méthodes basées sur la coloration des biofilms, plusieurs étapes ne sont pas bien standardisées, notamment les étapes de lavage qui sont très opérateur-dépendantes et peuvent influencer le résultat final. Ainsi, une autre méthode en microplaque appelée Ring Test[®] a été développée plus récemment (Chavant *et al.*, 2007).

IV-1. Mesure de la biomasse

IV-1-1. Crystal Violet

La méthode de quantification de la formation de biofilm utilisant le Crystal Violet (CV) a été décrite la première fois par Christensen *et al.* en 1985 (Christensen *et al.*, 1985), puis modifiée pour augmenter sa précision et permettre la quantification de la biomasse totale par resolubilisation du colorant (Extremina *et al.*, 2011). Le CV est un colorant basique qui se lie aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire. Les bactéries vivantes, les bactéries mortes et la matrice exopolysaccharidique sont donc colorées par le CV. Cependant, de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques peuvent influencer cette fixation.

Chaque puits de la microplaque est inoculé avec une suspension bactérienne. Après incubation de la microplaque, des étapes de lavage, de mise en contact avec le CV, de nouvelles étapes de lavage et de redissolution du colorant sont nécessaires pour mettre en évidence la formation de biofilm par une coloration violette (figure 13). La densité optique, mesurée par spectrophotométrie à 560 nm dans un lecteur de microplaque, est proportionnelle à la quantité de biomasse dans le puits de la microplaque.

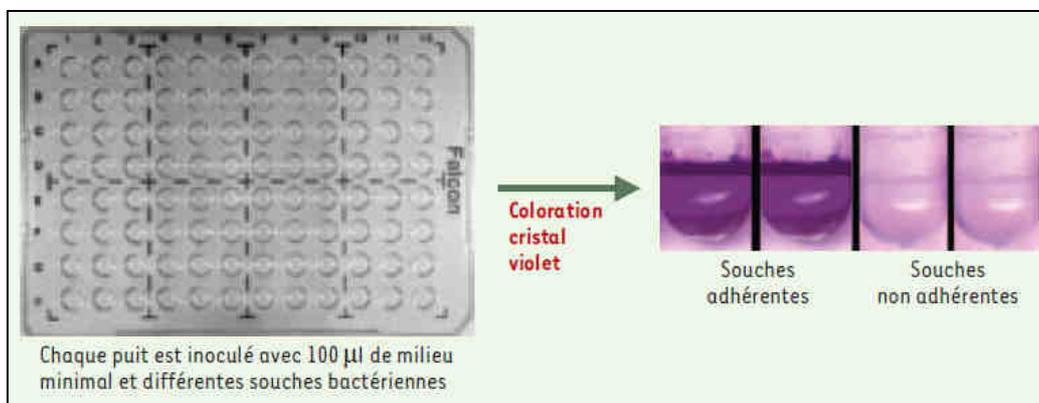


Figure 13 : Principe de la mesure de la biomasse par la méthode au Crystal Violet (Filloux & Vallet, 2003).

Le CV est un produit cancérigène, nocif en cas d'ingestion, d'inhalation ou de contact avec la peau et toxique pour l'environnement aquatique (figure 14).



Figure 14 : Toxicité du Crystal Violet (EMD, 2009)

IV-1-2. Syto9

Le Syto9 est un colorant vert fluorescent qui diffuse passivement à travers les membranes cellulaires et se lie à l'ADN présent à la fois chez les bactéries vivantes et chez les bactéries mortes, ainsi qu'à la matrice extracellulaire. Il permet une quantification de la biomasse du biofilm (Peeters *et al.*, 2008).

Le Syto9 a été utilisé pour la détection et la numération des bactéries au microscope confocal à balayage laser (CLSM) et pour les tests de quantification des biomasses des biofilms bactériens et fongiques (Honraet *et al.*, 2005).

IV-2. Mesure de la viabilité cellulaire

Il peut être intéressant de différencier les bactéries vivantes des bactéries mortes, notamment lorsque l'on teste l'effet d'agents antimicrobiens sur les bactéries au sein du biofilm. Des techniques de quantification basées sur l'activité métabolique des bactéries vivantes ont été développées.

IV-2-1. XTT (sel de tétrazolium)

Le XTT est un composé jaune pouvant être réduit par les bactéries métaboliquement actives en formazan, un colorant orange. Le formazan est soluble dans l'eau et peut être directement quantifié par spectrophotométrie.

Le test au XTT a été largement utilisé pour la quantification de cellules viables dans les cultures de bactéries planctoniques. Il a aussi été développé pour l'étude de la formation de biofilm chez des souches de *Candida* sp, et a montré son intérêt dans l'étude de la formation de biofilm chez d'autres espèces fongiques et bactériennes (Jin *et al.*, 2004; Peeters *et al.*, 2008; Pierce *et al.*, 2008).

Certaines limites à l'utilisation de ce réactif ont été décrites. Par exemple, la modification des états métaboliques des bactéries au cours des différentes étapes de formation des biofilms peuvent entraîner des fluctuations dans leurs capacités à métaboliser le colorant (Pierce *et al.*, 2008). De plus, des variabilités inter et intra-espèces ont été reportées (Honraet *et al.*, 2005).

IV-2-2. Résazurine

La résazurine est un colorant non toxique de couleur bleue qui peut être réduit par les bactéries métaboliquement actives en résorufine, un composé rose fluorescent. La quantité de résorufine, mesurée par fluorimétrie, est directement proportionnelle au nombre de bactéries viables présentes dans le milieu.

La résazurine a souvent été employée pour l'évaluation de la viabilité des bactéries planctoniques. Plus récemment, elle a été utilisée avec succès pour la quantification de la formation de biofilm en microplaque et pour évaluer l'efficacité d'agents antimicrobiens dans la lutte contre les biofilms chez différentes souches bactériennes et fongiques (Jiang *et al.*, 2011; Peeters *et al.*, 2008; Pettit *et al.*, 2005; Punithavathy *et al.*, 2012).

IV-2-3. FDA (fluorescéine diacétate)

Le FDA est un composé non fluorescent hydrolysable en un composé jaune, absorbant à 490 nm et très fluorescent, par des estérases intra et extracellulaires non spécifiques produites par les bactéries et les champignons viables.

Une étude a montré la supériorité du test au FDA pour la quantification des biofilms par rapport aux tests utilisant le XTT et le Syto9 (Honraet *et al.*, 2005). Les estérases responsables du clivage du FDA forment un groupe d'enzymes dont l'activité semble plus stable malgré les changements phénotypiques.

IV-3. Mesure de la matrice : le DMMB (1,9-dimethyl methylene blue)

La matrice extracellulaire est un élément essentiel à la formation et au maintien d'un biofilm mature. Le DMMB forme un complexe insoluble en présence des polysaccharides sulfatés de la matrice du biofilm. Le taux de colorant libéré après ajout d'une solution de décomplexation est mesuré par un spectrophotomètre : la densité optique est proportionnelle au taux de polysaccharides sulfatés présents dans la matrice.

Le test au DMMB a été initialement développé pour la détection d'aminoglycanes, puis a été optimisé pour permettre la quantification des biofilms à *S. aureus* (Tote *et al.*, 2008). Il a montré une bonne répétabilité pour différentes espèces bactériennes (Peeters *et al.*, 2008).

IV-4. BioFilm Ring Test[®]

La technique Ring Test[®] est basée sur l'immobilisation de billes magnétiques par la formation de biofilm au fond d'une microplaque. Les billes magnétiques sont rajoutées dans chaque puits contenant le milieu de culture et la microplaque est mise à incuber. Après ajout de liquide de contraste, une première lecture est réalisée. La microplaque est ensuite placée sur un support magnétique constitué de 96 aimants centrés sur chaque puits. Après contact magnétique, les billes libres vont se placer au fond du puits formant un spot rouge, tandis que celles bloquées par un biofilm vont rester en place (figure 15). Une seconde lecture est faite. Les images de chaque puits avant et après magnétisation sont analysées par un logiciel Biofilm Control[®] qui donne un indice de biofilm (BFI) allant de 0 à 30 : un BFI bas correspond à une faible mobilité des billes magnétiques et donc à une formation de biofilm (Chavant *et al.*, 2007). La technique Ring Test[®] n'a été validée qu'avec le milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion) filtré dans des microplaques en polystyrène.

Par rapport aux méthodes basées sur la coloration des biofilms, cette technique ne présente pas d'étape de lavage ni d'étape de coloration, ce qui limite les variations de résultats liées à l'opérateur et simplifie la technique. De plus, le Ring Test[®] permettrait de détecter plus précocement la formation de biofilm, dès l'étape d'adhérence des bactéries à la surface de la microplaque (Chavant *et al.*, 2007; Nagant *et al.*, 2010).

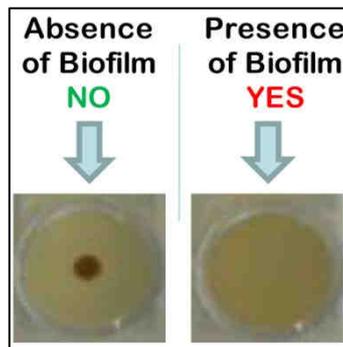
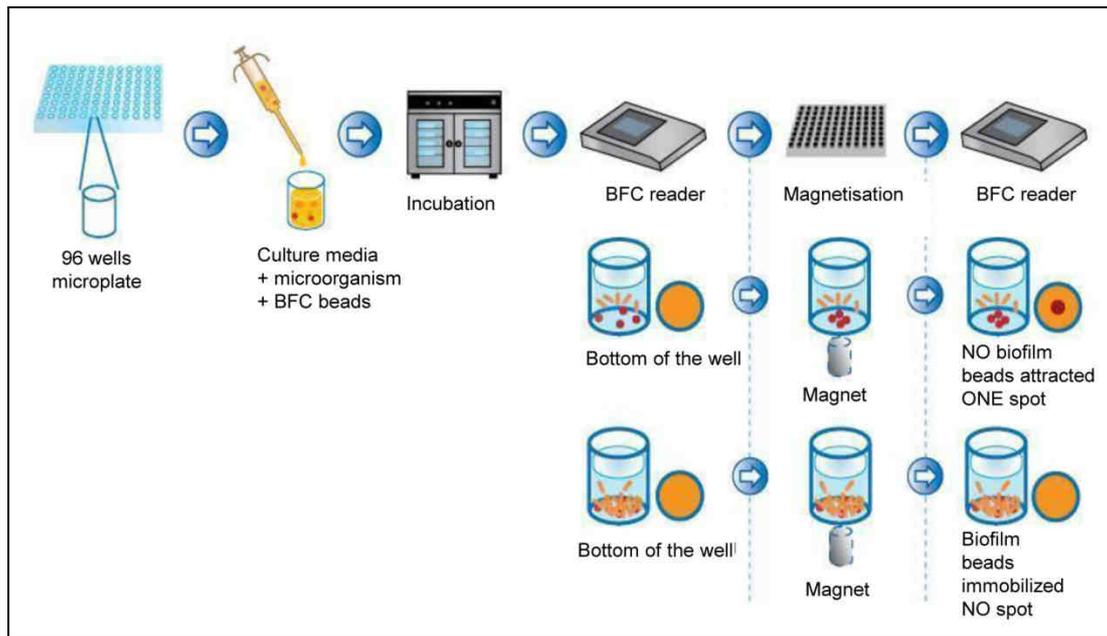


Figure 15 : Principe de la méthode BioFilm Ring Test[®]
 (<http://www.biofilmcontrol.com/procedure.html>)

IV-5. Méthodes dynamiques

En parallèle des méthodes en microplaques, il existe des systèmes de chambres en flux, c'est-à-dire continuellement approvisionnées en nutriments avec une élimination des déchets. Le biofilm se forme dans des conditions hydrodynamiques choisies et l'environnement peut être facilement contrôlé et/ou modifié. De plus, ces systèmes permettent un monitoring du biofilm formé, sans le détruire, à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser. On peut ainsi obtenir des images de biofilms à tous les stades de leur développement (Coenye, 2010).

MATERIEL ET METHODES

I. Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il n'existe pas de technique standardisée et universelle pour étudier *in vitro* la production du biofilm par différentes souches bactériennes. Par ailleurs, il a déjà été mis en évidence dans différentes études que la formation de biofilm *in vitro* était fortement dépendante des conditions expérimentales telles que le milieu de culture, le type de microplaque utilisée, la durée ou les conditions d'incubation. De plus, la classification des souches en faiblement ou fortement productrices de biofilm reste très arbitraire et variable d'une étude à l'autre (Hancock *et al.*, 2011; Naves *et al.*, 2008a; Reisner *et al.*, 2006). Notre étude s'inscrit dans la continuité de différentes études réalisées au laboratoire sur la production de biofilm par différentes cohortes de souches cliniques de *E. coli*, en particulier une cohorte de souches isolées d'infections ostéo-articulaires (Crémet *et al.*, 2012). L'objectif principal de notre étude était d'évaluer l'influence de diverses conditions de croissance sur la capacité de ces souches de *E. coli* à former du biofilm *in vitro*.

De plus, de nombreux composants de surface comme les flagelles, les fimbriae de type 1, les curli ou le Poly- β -1,6-N-acétyl-glucosamine (PGA) sont connus pour contribuer à la formation de biofilm chez *E. coli*. Le second objectif de cette étude était d'évaluer le rôle de ces différents facteurs dans la production de biofilm sur une collection de souches bien caractérisées.

II. Souches bactériennes

Dix souches de *E. coli* ont été sélectionnées pour cette étude, dont une souche de collection, l'ATCC 25922 décrite comme fortement productrice de biofilm (Naves *et al.*, 2008a), et neuf

souches cliniques isolées de patients hospitalisés au CHU de Nantes. Ces souches provenaient de prélèvements ostéoarticulaires (3), de selles (2), de liquide gastrique (2), de liquide péritonéal (1) et d'urine sur sonde à demeure (1). Parmi ces souches, cinq avaient été détectées comme productrices de biofilm lors de précédentes études réalisées au laboratoire, certaines en milieu LB (Luria Bertani) (n=3), d'autres en milieu BHI (Brain Heart Infusion) (n=2).

Tableau 3 : Présentation des dix souches de notre cohorte.

IOAM : infection ostéoarticulaire sur matériel, URSAD : urine sur sonde à demeure

Souche	Origine	Groupe phylogénétique	Résultats d'études précédentes en Crystal Violet
8003586	IOAM	B2	- (LB glucosé)
30902105	IOAM	B2	+ (LB glucosé)
30905378	IOAM	B2	+ (LB glucosé)
30315004	Coproculture	B2	+ (LB glucosé)
30194084	Coproculture	D	- (LB glucosé)
ATCC 25922		B2	+ (BHI/LB glucosé)
1958	Gastrique	B1	+ (BHI)
1923	Gastrique	B1	- (BHI)
7148	Péritonéal	D	+ (BHI)
2027	URSAD	D	- (BHI)

III. Les tests de formation de biofilm en microplaque

III-1. Culture bactérienne

Pour la réalisation des tests de formation de biofilm en microplaque, chaque souche a été isolée sur gélose TS (Trypticase Soja) à partir de congélation, puis ré-isolée sur pente TS le lendemain matin et mise en bouillon BHI le soir. Après 18 à 24 heures d'étuve à 37°C, des suspensions à 2,5 Mac Farland ont été préparées dans du BHI, puis diluées au 1/250^{ème} dans le milieu de culture testé selon les expériences. 200 µL de ces suspensions bactériennes ont étéensemencées dans les puits d'une microplaque.

III-2. Test au Crystal Violet

Pour chaque expérience, chaque suspension bactérienne a été inoculée dans 8 puits d'une microplaque de 96 puits à fond plat en polystyrène à 37°C sans agitation. Une rangée de la microplaque était occupée par un blanc, correspondant au milieu de culture seul. La croissance bactérienne a été évaluée par un spectrophotomètre avec une lecture des densités optiques (DO) à 620 nm. Les bactéries adhérentes à la microplaque ont été lavées deux fois avec 200 µL d'eau distillée stérile. La microplaque a été laissée 20 minutes à l'air libre, puis chaque puits a été mis en contact avec 200 µL d'une solution de Crystal Violet à 1% pendant 5 minutes. Tous les puits ont été lavés 4 fois avec 200 µL d'eau distillée stérile puis séchés pendant 1 heure à l'air libre. Le colorant a été remis en solution par 200 µL d'éthanol absolu et les DO ont été mesurées à 560 nm. La quantification du biofilm a été calculée selon la formule :

$$SBF = (AB-CW)/G$$

dans laquelle

- SBF est l'indice de formation de biofilm spécifique (Specific Biofilm Formation),
- AB la DO à 560 nm de la souche testée,
- CW la DO à 560 nm du blanc,
- G la DO à 620 nm de la croissance de la souche testée.

Pour chaque condition expérimentale, toutes les souches ont été testées trois fois dans des expériences indépendantes.

III-3. Méthode BioFilm Ring Test[®]

Pour la méthode Ring Test[®], la dilution au 1/250^{ème} a été faite dans du milieu de culture BHI filtré. 10 µL de Toner, contenant les billes magnétiques, ont été rajoutés à cette suspension bactérienne et au contrôle, correspondant au milieu de culture seul. Ce mélange a été inoculé dans 2 puits d'une microplaque pour chaque échantillon et le contrôle. Après 24 heures d'incubation en chambre humide, les puits ont été recouverts de liquide de contraste. La plaque a été scannée par le lecteur de plaque pour obtenir une image de chaque puits (image I₀) puis placée pendant une minute sur le support magnétique avant une deuxième lecture (image I₁). L'analyse des images I₀ et I₁ par le logiciel BioFilm Control[®] donne l'indice de biofilm (BFI). Un BFI bas correspond à l'immobilisation des billes (présence de biofilm),

alors qu'une valeur élevée correspond à une forte mobilité des billes paramagnétiques (absence de formation de biofilm).

Par cette méthode, chaque souche a été testée au minimum dans 2 puits à chaque manipulation et pour chaque souche, au minimum deux expériences indépendantes ont été réalisées. Le nombre d'expériences réalisées est inférieur à celui du Crystal Violet, essentiellement pour des raisons de coût.

III-4. Variation des conditions expérimentales

Pour le Crystal Violet, la formation de biofilm a été testée selon différentes conditions expérimentales suivantes :

- modification de la durée d'incubation : croissance en BHI incubé en aérobiose pendant 24 heures et 48 heures
- modification de l'atmosphère d'incubation : croissance en BHI incubé en aérobiose et en anaérobiose (les microplaques ont été incubées dans un GASPAC[®]),
- modification du milieu de culture : croissance en milieu BHI et en milieu LB supplémenté ou non par 0,5 % et par 1 % de glucose.

Pour le Ring Test[®], la formation de biofilm en aérobiose et en anaérobiose a été comparée. La croissance en milieu LB supplémenté ou non en glucose a été testée mais ce milieu de culture n'est pas validé pour la méthode Ring Test[®].

Tableau 4 : Composition des milieux BHI et LB

Milieu BHI	Milieu LB
Infusion de cervelle de veau : 12,5 g/L	Bactotryptone (peptones) : 10 g/L
Protéose peptone : 10 g/L	Extraits de levures : 5 g/L
Infusion de cœur de bœuf : 5 g/L	NaCl : 5 g/L
NaCl : 5 g/L	H ₂ O distillée qsp 1 L
Phosphate disodique : 2,5 g/L	
Glucose : 2 g/L	
H ₂ O distillée qsp 1 L	

III-5. Classification des isolats

Pour la méthode au Crystal Violet, les souches ont été classées arbitrairement en trois catégories selon leur degré de formation de biofilm:

- peu productrice de biofilm ($SBF < 0,20$)
- modérément productrice de biofilm ($0,20 \leq SBF < 0,4$)
- fortement productrice de biofilm ($SBF \geq 0,4$)

Pour la méthode BioFilm Ring Test[®], l'interprétation a été faite selon les recommandations du fournisseur :

- Absence de biofilm constitué ($BFI \geq 7$)
- Présence de biofilm en formation ($2 < BFI < 7$)
- Présence de biofilm constitué ($BFI \leq 2$).

III-6. Analyse statistique

L'analyse statistique de nos résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Graphpad Prism version 4.00 pour Windows.

IV. Etude de la mobilité des souches

Les dix souches ont été ensemencées par pique centrale d'une gélose mobilité (milieu TIMM 2,5 pour 1000, composé de Bactotryptone broth 29,5 g/L, Agar 2,5 g/L, Rouge de phénol 1 % 4 mL, H₂O qsp 1 L à pH 7,3). Le diamètre de mobilité a été mesuré après 7 heures d'incubation à 37°C.

V. Recherche des gènes *pgaA*, *csgA* et *fimH* par PCR

Trois gènes de virulence ont été recherchés par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les amorces spécifiques .

Le gène codant pour un pour le Poly-β-1,6-N-acétyl-glucosamine (*pgaA*) avec les amorces :

- pgaAF (5'-AGGGACTGCGCATTGATTAC-3')
- pgaAR (5'-GTTACGTTTCGACAACATCG-3').

Le gène codant pour la sous-unité majeure des curli (*csgA*) avec les amorces :

- *csgAF* (5'-GGGCTCAGATGACAGCTCAATC-3')
- *csgAR* (5'-GCCGTTCCACTGATCAAGAGTAG-3').

Et le gène codant pour une adhésine de type 1 (*fimH*) à l'aide des amorces :

- *fimH2* (5'-GATCTTTTCGACGCAAATC-3')
- *fimH17* (5'-CGAGCAGAAACATCGCAG-3').

L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL contenant 1X de tampon, (Promega), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque nucléotide, 0,5 µM de chaque amorce, 2,5 unités de Taq DNA polymérase et 10 µL d'extrait d'ADN. Après 90 secondes de dénaturation à 94°C, 30 cycles consistant chacun en 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et 1 minute d'extension à 72°C ont été réalisés, suivis par une étape d'extension finale de 7 minutes à 72°C.

VI. Recherche de l'expression de *fimH* et *csgA* par RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) permet d'étudier le niveau de transcription de gènes. Il s'agit de réaliser une PCR après transcription inverse, par des reverse transcriptases, d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc).

VI-1. Culture bactérienne

Cinq de nos souches ont été isolées sur gélose TS à partir de congélation, puis ré-isolées sur pente TS le lendemain matin et mises en bouillon BHI le soir. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, des suspensions à 0,5 Mac Farland ont été préparées dans du BHI puis 10 µL de cette pré-culture ont étéensemencés avec 10 mL de BHI. La culture a été arrêtée lorsque la DO à 620 nm était comprise entre 0,2 et 0,3 selon les recommandations du fournisseur.

VI-2. Extraction des ARN bactériens

L'extraction des ARN bactériens a été réalisée avec le kit RNeasy[®] Mini suivant les recommandations du fournisseur QIAGEN[®]. La quantité d'ARN totaux extraits a ensuite été évaluée au nanodrop. Un traitement à la DNAase a ensuite été réalisé et des PCR *gapA*, un gène de ménage, ont été réalisées sur 1 µL d'ARN traité, 1 µL d'ARN non traité et 1 µL d'ADN (témoin positif), pour vérifier l'absence de traces d'ADN.

VI-3. RT-PCR

Chaque extrait a fait l'objet de deux RT-PCR en parallèle (le gène d'intérêt, *fimH* et *csgA*, et le gène de ménage *gapA* servant de contrôle interne). En dehors des amorces, l'ensemble des réactifs était compris dans le coffret (Kit-Takara). L'amplification a été réalisée dans un volume final de 25 µL contenant 12,5 µL de tampon 2X, 8,5 µL d'H₂O RNase free, 0,5 µL de RT enzyme (reverse transcriptase), 0,5 µL d'amorce F à 10 µM, 0,5 µL d'amorce R à 10 µM, 0,5 µL de Taq Polymérase et 2 µL d'extrait. Les cycles d'amplification ont été réalisés sur l'automate Rotor-Gene 6000 selon le programme suivant : une première étape de transcription inverse (5 minutes à 42°C et 10 secondes à 95°C), une deuxième étape de PCR (5 secondes à 95°C puis 20 secondes à 60°C, répétés 40 fois) et une troisième étape de dissociation.

RESULTATS

I. Détection de la production de biofilm par les 10 souches de *E. coli*

Nous avons recherché par deux méthodes différentes si les souches de *E. coli* de notre cohorte étaient capables de former du biofilm *in vitro*. Quelle que soit la méthode utilisée, il existe manifestement une grande variabilité dans la capacité des souches cliniques à produire du biofilm.

I-1. Méthode au Crystal Violet

La première méthode, dérivée de celle décrite par Christensen, a montré qu'en milieu BHI incubé en aérobiose, seules trois de nos dix souches étaient retrouvées fortement productrices de biofilm dans les conditions choisies (ATCC 25922, 1958 et 7148) (tableau 5). Les résultats présentés ici sont les moyennes de 9 expériences indépendantes. Pour chaque expérience, chaque souche a été testée dans 8 puits (figure 16). A noter que les souches fortement productrices de biofilm proviennent de prélèvements différents et appartiennent à des groupes phylogénétiques différents (B1, B2 et D).

Tableau 5 : Indice de formation de biofilm (SBF) calculé pour l'ensemble des souches testées par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI incubé en aérobiose.
(en vert : souche fortement productrice de biofilm).

Souche	Origine	Groupe phylogénétique	Moyenne SBF (n=9)	+/-Ecart-Type
8003586	IOAM	B2	0,114	+/-0,035
30902105	IOAM	B2	0,058	+/-0,038
30905378	IOAM	B2	0,126	+/-0,023
30315004	Coproculture	B2	0,061	+/-0,032
30194084	Coproculture	D	0,101	+/-0,044
ATCC 25922		B2	0,490	+/-0,090
1958	Gastrique	B1	0,726	+/-0,206
1923	Gastrique	B1	0,090	+/-0,031
7148	Péritonéal	D	0,648	+/-0,206
2027	URSAD	D	0,089	+/-0,033

8003586	30902105	30905378	30315004	30194084	ATCC 25922	1958	1923	7148	2027	Blanc
---------	----------	----------	----------	----------	------------	------	------	------	------	-------

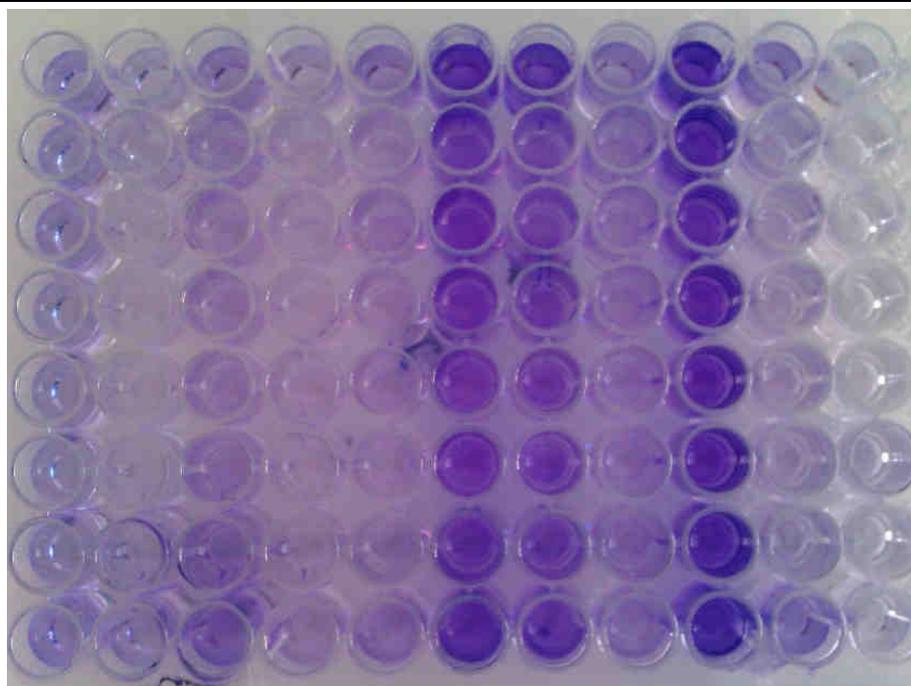


Figure 16 : Photographie d'une microplaque après redissolution du Crystal Violet. Après incubation et lavages, le colorant s'attache à la biomasse. En présence de biofilm, on observe une coloration violette des puits.

I-2. Méthode du BioFilm Ring Test[®]

Dans les mêmes conditions de culture, la seconde méthode, le BioFilm Ring Test[®], a permis de caractériser une formation de biofilm chez sept de nos souches, dont les trois souches positives en Crystal Violet (tableau 6, figure 17). On peut remarquer l'écart-type important obtenu pour la souche 2027, pour laquelle quatre expériences indépendantes ont été réalisées.

Tableau 6 : Indice de formation de biofilm (BFI) calculé pour l'ensemble des souches testées par la méthode Ring Test[®] en milieu BHI filtré incubé en aérobiose.

En vert : présence de biofilm constitué (BFI < 2).

En jaune : biofilm en cours de formation (2 < BFI < 7).

Souche	Moyenne BFI	+/-Ecart-Type
8003586	10,53	+/- 0,80
30902105	1,56	+/- 0,34
30905378	1,55	+/- 0,33
30315004	1,29	+/- 0,01
30194084	6,00	+/- 2,00
ATCC 25922	1,76	+/- 1,08
1958	1,49	+/- 0,20
1923	13,44	+/- 3,07
7148	3,00	+/- 1,73
2027	8,83	+/- 6,26



Figure 17 : Photographie d'une microplaque en méthode Ring Test[®]. Après incubation, un aimant est disposé sous le fond des puits. En l'absence de biofilm, toutes les microbilles sont attirées dans le fond du puits et forment un spot central (BFI > 7). Lors de la formation de biofilm, les microbilles sont immobilisées et il n'y a pas de spot central.

I-3. Corrélation entre les deux méthodes

La corrélation entre les deux méthodes n'est pas bonne (Spearman $r = -0,1$; $p = 0,78$) (figure 17), essentiellement parce que 3 souches peu productrices de biofilm par la méthode au Crystal Violet apparaissent formatrices de biofilm en méthode Ring Test[®].

Pour la suite des expériences, nous avons essentiellement utilisé la méthode au Crystal Violet, moins coûteuse, et considérée comme le « gold standard » pour étudier le biofilm en microplaque.

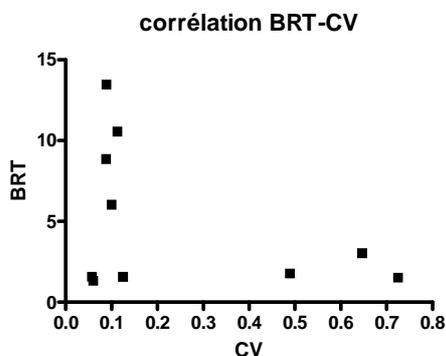


Figure 18 : Corrélation entre les méthodes Crystal Violet et BioFilm Ring Test[®] (BRT).

II. Influence des conditions de culture

II-1. Influence de la durée d'incubation

Une seule expérience a été réalisée pour tester l'influence de la durée d'incubation des microplaques sur la formation de biofilm *in vitro*. Nous avons observé une augmentation significative des indices de formation de biofilm pour chaque souche lorsque la durée d'incubation est prolongée (Wilcoxon : $p= 0,02$). Cependant, selon les seuils choisis, les souches ATCC 25922, 1958 et 1923 étaient encore les seules considérées comme fortement productrices de biofilm après 48 heures d'incubation (Tableau 7). La suite des expériences a été réalisée avec une incubation de 24 heures, durée d'incubation utilisée dans la majorité des études publiées.

Tableau 7 : SBF calculé pour l'ensemble des souches testées par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI incubé 24 h et 48 h.

Souche	Moyenne SBF BHI 24h (n=1)	Moyenne SBF BHI 48h (n=1)	Moyenne 48h/24h (%) (n=1)
8003586	0,096	0,226	235,996
30902105	0,108	0,148	137,001
30905378	0,147	0,195	132,712
30315004	0,136	0,156	114,329
30194084	0,128	0,193	150,516
ATCC 25922	0,384	0,740	192,845
1958	0,637	1,023	160,658
1923	0,120	0,148	124,212
7148	0,480	0,586	122,235
2027	0,152	0,162	106,860

II-2. Influence de l'atmosphère d'incubation

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'atmosphère d'incubation sur la production de biofilm *in vitro* par nos souches de *E. coli*.

Par la méthode au Crystal Violet, l'indice de formation de biofilm décroît pour 7 souches lorsque la microplaque est incubée en anaérobiose, mais le niveau de décroissance est variable selon les souches. Les 3 souches ne diminuant pas leur formation de biofilm (30902105, 30905378 et 30315004) sont des souches peu productrices de biofilm en aérobiose, avec des valeurs de SBF très faibles dans les deux conditions. Parmi les 3 souches modérément ou fortement productrices de biofilm en aérobiose (ATCC 25922, 1958 et 7148), seule la souche 1958 en produit encore en anaérobiose mais avec un SBF plus faible (tableau 8). La corrélation entre les deux conditions d'incubation est mauvaise (Spearman : $r = 0,56$ $p = 0,09$). Les résultats présentés ici sont ceux des 3 expériences comparant en même temps l'incubation en aérobiose et l'incubation en anaérobiose (conditions strictement identiques sauf l'oxygénation).

Tableau 8 : SBF calculé pour l'ensemble des souches de *E. coli* par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI incubé en aérobiose et en anaérobiose.

Souche	Moyenne SBF BHI aérobic (n=3)		Moyenne SBF BHI anaérobic (n=3)		Moyenne ana/ moyenne aé (%)
8003586	0,102	+/-0,043	0,075	+/-0,023	73,11
30902105	0,091	+/-0,054	0,094	+/-0,029	103,64
30905378	0,118	+/-0,025	0,134	+/-0,070	113,32
30315004	0,086	+/-0,046	0,103	+/-0,036	119,77
30194084	0,123	+/-0,053	0,081	+/-0,029	65,80
ATCC 25922	0,483	+/-0,114	0,147	+/-0,041	30,46
1958	0,638	+/-0,009	0,570	+/-0,247	89,37
1923	0,101	+/-0,040	0,064	+/-0,037	63,53
7148	0,643	+/-0,276	0,131	+/-0,102	20,41
2027	0,101	+/-0,044	0,075	+/-0,070	74,62

Avec la méthode Ring Test[®], une seule expérience a été réalisée pour comparer aérobiose et anaérobiose, dans les mêmes conditions et avec les mêmes inoculum (Tableau 9). Elle confirme les résultats observés par la méthode au Crystal Violet, c'est-à-dire une diminution de la formation de biofilm en anaérobiose pour la majorité des souches. Deux souches restent productrices de biofilm (30905378 et ATCC 25922). La souche 1958 qui forme encore du biofilm en anaérobiose par la méthode au Crystal Violet ne montre plus de formation de biofilm par la méthode Ring Test[®].

Tableau 9 : BFI calculé pour l'ensemble des souches de *E. coli* par la méthode Ring Test[®] en milieu BHI filtré incubé en aérobiose et en anaérobiose.

Souche	Moyenne BFI BHI aérobie (n=1)	Moyenne BFI BHI anaérobie (n=1)
8003586	9,96	15,33
30902105	1,32	8,13
30905378	1,78	1,41
30315004	1,29	10,02
30194084	4,20	13,52
ATCC 25922	1,21	1,38
1958	1,72	12,74
1923	12,23	14,72
7148	4,69	9,93
2027	3,75	13,71

II-3. Influence du milieu de culture

Nous avons ensuite étudié l'influence du milieu de culture sur la formation de biofilm *in vitro*. Les milieux testés sont le BHI, le LB et le LB supplémenté par 0,5 % et par 1 % de glucose.

II-3-1. Comparaison des milieux BHI et LB

Une augmentation de la production de biofilm plus ou moins importante est visible pour 9 de nos 10 souches en milieu LB par rapport au milieu BHI (n=5). Malgré cette augmentation et selon les seuils attribués dans notre étude, seules les souches ATCC 25922, 1958 et 7148 sont fortement productrices de biofilm en milieu LB, c'est-à-dire comme en milieu BHI (Tableau 10) : la formation de biofilm dans les deux milieux est bien corrélée (Spearman : $r= 0,72$; $p= 0,02$).

Nous avons également voulu comparer les milieux de culture par la méthode Ring Test[®] mais les tests réalisés avec le milieu de culture LB filtré sont ininterprétables, le blanc donnant des valeurs de BFI très faible. Il est d'ailleurs recommandé par le fournisseur d'utiliser le milieu BHI filtré pour cette technique.

Tableau 10 : SBF calculé pour l'ensemble des souches de *E. coli* par la méthode au Crystal Violet en milieu BHI et en milieu LB incubés en aérobiose.

Souche	Moyenne SBF BHI (n=5)	Moyenne SBF LB (n=5)	Moyenne LB/BHI (%)
8003586	0,119 +/-0,031	0,146 +/-0,067	122,90
30902105	0,037 +/-0,012	0,210 +/-0,172	566,25
30905378	0,126 +/-0,016	0,180 +/-0,082	143,20
30315004	0,052 +/-0,016	0,068 +/-0,035	130,32
30194084	0,097 +/-0,043	0,094 +/-0,025	97,07
ATCC 25922	0,534 +/-0,096	0,738 +/-0,340	138,17
1958	0,627 +/-0,103	1,578 +/-1,207	251,62
1923	0,102 +/-0,028	0,127 +/-0,100	124,46
7148	0,672 +/-0,251	0,977 +/-0,550	145,43
2027	0,075 +/-0,009	0,097 +/-0,051	129,55

II-3-2. Comparaison des milieux LB et LB supplémenté en glucose

En présence de LB supplémenté avec 0,5 % de glucose, on observe une augmentation de la production de biofilm par 7 souches par rapport au LB non supplémenté, par la méthode au Crystal Violet (n=4) (tableau 11). Selon nos seuils, les souches 30902105, 30905378 et 30194084 deviennent modérément productrices de biofilm en présence de 0,5 % de glucose. En revanche, la souche 7148, fortement productrice de biofilm en milieu LB non supplémenté n'en forme plus en présence de glucose. La corrélation entre la formation de biofilm en absence et en présence de 0,5 % de glucose n'est pas bonne (Spearman : $r=0,57$; $p=0,08$).

Des résultats similaires ont été observés avec la comparaison du milieu LB et du milieu LB supplémenté avec 1 % de glucose (n=4) (Spearman : $r=0,38$; $p=0,27$).

Tableau 11 : SBF calculé pour l'ensemble des souches de *E. coli* par la méthode au Crystal Violet en milieu LB et en milieu LB supplémenté par 0,5% de glucose incubés en aérobiose.

Souche	Moyenne SBF LB (n=4)	Moyenne SBF LB 0,5% (n=4)	Moyenne SBF LB 1% (n=4)	Moyenne LB0,5%/LB	Moyenne LB1%/LB
8003586	0,141 +/-0,067	0,071 +/-0,013	0,093 +/-0,026	52,11	68,29
30902105	0,178 +/-0,176	0,240 +/-0,173	0,303 +/-0,023	127,37	160,54
30905378	0,182 +/-0,087	0,380 +/-0,104	0,462 +/-0,208	219,20	266,34
30315004	0,070 +/-0,040	0,149 +/-0,016	0,178 +/-0,018	228,15	272,29
30194084	0,091 +/-0,028	0,288 +/-0,084	0,371 +/-0,095	310,20	398,88
ATCC25922	0,660 +/-0,265	1,209 +/-0,170	1,163 +/-0,186	173,22	166,67
1958	1,555 +/-1,435	0,739 +/-0,128	0,790 +/-0,107	51,31	54,87
1923	0,153 +/-0,099	0,131 +/-0,033	0,142 +/-0,029	107,72	116,58
7148	1,052 +/-0,336	0,175 +/-0,035	0,152 +/-0,037	18,09	15,69
2027	0,114 +/-0,053	0,171 +/-0,043	0,161 +/-0,033	169,49	159,09

III. Etude des mécanismes susceptibles d'influencer la production de biofilm

III-1. Etude de la mobilité des souches

La mobilité est considérée par certains auteurs comme un facteur impliqué dans la capacité des souches à former du biofilm. La mobilité a été étudiée sur une gélose semi-molle de type TIMM (figure 19).

Les souches les plus mobiles sont les souches 30194084 et 7148 (> 4 cm). Les moins mobiles sont les souches 8003586 et 1958 (≤ 1 cm) (tableau 12). Les souches 7148 et 1958 sont donc deux souches fortement productrices de biofilm dont la mobilité est très différente. De la même façon, parmi les souches peu productrices de biofilm, certaines sont très mobiles et d'autres non. Ainsi, dans notre cohorte, on n'observe pas de corrélation directe entre la mobilité des souches et leur capacité à former du biofilm.



Figure 19 : Photographie d'une gélose mobilité après 7h d'incubation. Le cercle jaune correspond à la mobilité de la souche.

Tableau 12 : Diamètre de mobilité mesuré en cm sur gélose mobilité après 7h d'incubation.

Souche	Production de biofilm (CV – BHI)	Diamètre (cm)
8003586	-	0,5
30902105	-	2,5
30905378	-	2,7
30315004	-	2,5
30194084	-	5
ATCC 25922	++	2,5
1958	++	1
1923	-	5
7148	++	4,7
2027	-	2,3

III-2. Etude de gènes impliqués dans la formation de biofilm

III-2-1. Recherche des gènes *pgaA*, *csgA* et *fimH* par PCR

La présence de gènes *pgaA*, *csgA* et *fimH*, connus pour leur implication dans la production de biofilm chez *E. coli*, a été recherchée sur toutes nos souches par PCR (tableau 13). Les gènes *csgA*, codant pour la sous-unité majeure des curli CsgA, et *fimH*, codant pour l'adhésine fimbriae de type 1, sont présents chez toutes les souches. Le gène *pgaA*, codant pour le Poly- β -1,6-N-acétyl-glucosamine, est présent chez 70% de nos souches. La souche 7148, fortement productrice de biofilm en milieu BHI et en milieu LB, est négative pour le gène *pgaA*. A l'inverse certaines souches peu ou non productrices de biofilm dans les conditions testées *in vitro* possèdent ce gène. La présence de ces gènes ne permet donc pas à elle seule de comprendre les différences importantes de production de biofilm observées.

Malgré le faible effectif, on peut noter que l'absence du gène *pgaA* semble associée au groupe phylogénétique D.

Tableau 13 : Recherche de gènes de virulence *pgaA*, *csgA* et *fimH* par PCR.

Souche	Groupe phylogénétique	<i>csgA</i>	<i>pgaA</i>	<i>fimH</i>
8003586	B2	+	+	+
30902105	B2	+	+	+
30905378	B2	+	+	+
30315004	B2	+	+	+
30194084	D	+	-	+
ATCC 25922	B2	+	+	+
1958	B1	+	+	+
1923	B1	+	+	+
7148	D	+	-	+
2027	D	+	-	+

III-2-2. Etude de l'expression de gènes impliqués dans la production de biofilm

L'expression des gènes *csgA* et *fimH* a ensuite été recherchée par RT-PCR sur des extraits d'ARN de cinq de nos souches (ATCC 25922, 1958, 1923, 7148 et 2027). Deux séries de RT-PCR sur des extraits d'ARN différents ont été réalisées. Le gène de ménage *gapA*, servant de contrôle interne, est bien exprimé par toutes les souches (présence de Ct moyens allant de 9 à 12,7). Pour *csgA* et *fimH*, nous avons calculé des ratios de Ct par rapport à *gapA* (tableau 14). Ces gènes semblent être exprimés par toutes nos souches mais à des degrés différents. Le gène *fimH* serait plus exprimé par les souches 7148 et 2027 et le gène *csgA* par les souches 1958, 1923 et surtout la 7148. La souche ATCC 25922 ne semble pas exprimer beaucoup ses gènes *fimH* et *csgA* bien que ce soit une souche productrice de biofilm. A l'inverse, les souches 1923 et 2027 expriment respectivement beaucoup leurs gènes *csgA* et *fimH* mais ne forment pas de biofilm *in vitro*. Cependant, à la vue de nos courbes de fusion, l'interprétation de ces résultats est difficile et des études complémentaires doivent être réalisées. Quoi qu'il en soit, aucun élément évident ne permet d'expliquer les différences majeures observées dans la production de biofilm *in vitro*.

Tableau 14 : Moyenne des Ct obtenus pour *gapA* et des ratios pour *fimH* et *csgA* des souches testées par RT-PCR.

	ATCC25922	1958	1923	7148	2027
<i>moyenne Ct gapA</i>	9,04	9,41	10,29	12,69	9,96
<i>moyenne ratio fimH</i>	2,57	2,36	2,40	1,82	1,92
<i>moyenne ratio csgA</i>	2,27	1,84	1,68	1,02	2,24

DISCUSSION

La capacité d'une souche à former du biofilm est reconnue comme étant un important facteur de virulence chez de nombreuses espèces bactériennes, dont *E. coli*. Le rôle pathogène des biofilms est maintenant bien établi dans de nombreuses infections chroniques et infections sur matériel. Leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques en font de véritables problèmes de Santé publique. Il serait donc intéressant pour les laboratoires de Bactériologie médicale de disposer d'une technique universelle (phénotypique ou génotypique) permettant de prédire *in vitro* la capacité d'une souche à former du biofilm. De nombreuses méthodes d'étude du biofilm ont été décrites, en particulier pour les staphylocoques (Oliveira & Cunha Mde, 2010; Sandberg *et al.*, 2009; Tote *et al.*, 2008). Au cours de ce travail de Thèse, nous en avons utilisé deux : la méthode au Crystal Violet, la plus anciennement utilisée qui fait office de référence, et une méthode plus innovante, le Ring Test[®].

La majorité des auteurs utilise une coloration au Crystal Violet pour quantifier le biofilm formé. C'est une méthode assez laborieuse et difficile à standardiser. Il existe de considérables variations entre les protocoles, notamment dans le choix des inoculums bactériens, la température et la durée d'incubation, la méthodologie des lavages, la concentration du colorant ou encore la durée de coloration (Chavant *et al.*, 2007; Nagant *et al.*, 2010; Naves *et al.*, 2008a; Peeters *et al.*, 2008; Reisner *et al.*, 2006; Skyberg *et al.*, 2007). Le seuil de positivité définissant une souche productrice de biofilm varie également selon les études. La comparaison des résultats entre les différentes publications est donc assez délicate. De plus, cette méthode évalue la biomasse, qui peut être constituée de bactéries viables, mais aussi de bactéries mortes. Par ailleurs, on peut rajouter que le Crystal Violet est un colorant toxique, qui doit être manipulé avec précaution.

La seconde méthode que nous avons utilisée, le Ring Test[®], est beaucoup plus récente : elle évalue l'immobilisation de billes magnétiques par les bactéries organisées en biofilm (Chavant *et al.*, 2007). Cette méthode a l'avantage de ne pas avoir d'étape de lavage ni d'étape de coloration, limitant les variations de résultats liées à l'opérateur et simplifiant la technique.

Quelle que soit la technique utilisée, il apparaît que dans des conditions définies, il existe une grande variabilité de la capacité des souches cliniques de *E. coli* à produire du biofilm, comme cela a déjà été montré par certains auteurs (Naves *et al.*, 2008a; Reisner *et al.*, 2006; Skyberg *et al.*, 2007). Malgré notre faible effectif, celle-ci n'apparaît pas directement liée à un site d'isolement particulier de la souche ou à un groupe phylogénétique donné. Les deux souches les plus productrices de biofilm par la méthode au Crystal Violet appartiennent respectivement aux groupes B1 et D, et ont été isolées pour l'une d'un liquide péritonéal, et pour l'autre d'un liquide gastrique de nouveau-né.

La corrélation entre les résultats des deux techniques n'est pas parfaite, probablement parce qu'elles n'évaluent pas exactement les mêmes étapes de formation du biofilm.

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont déjà mis en évidence l'influence des conditions environnementales sur la capacité des souches à former du biofilm *in vitro*, comme la température, l'osmolarité, l'oxygène, le pH ou la présence de nutriments (Ursic *et al.*, 2008). Dans notre étude, nous avons comparé la formation de biofilm par 10 souches de *E. coli* bien caractérisées dans différentes conditions expérimentales.

Peu d'études ont recherché l'impact de la présence d'oxygène sur la formation de biofilm. Pourtant, ce paramètre semble important dans certaines situations cliniques *in vivo*.

Une seule étude a montré chez un isolat de *E. coli* K12 que la production de biofilm est considérablement réduite en l'absence d'oxygène (Colon-Gonzalez *et al.*, 2004). Nous avons également pu observer une diminution significative de la formation de biofilm lorsque les microplaques ont été incubées en anaérobiose. Deux souches productrices de biofilm en aérobiose n'ont plus montré de formation de biofilm en anaérobiose, mais une souche a cependant conservé un indice de formation de biofilm élevé. L'effet du manque d'oxygène a également été étudié chez d'autres espèces bactériennes avec des résultats variables (Stepanovic *et al.*, 2003; Ursic *et al.*, 2008). Bien entendu, il serait intéressant de pouvoir réaliser des variations plus fines de la concentration en O₂.

Il est également décrit que la formation de biofilm *in vitro* peut varier considérablement d'un milieu de culture à l'autre (Corona-Izquierdo & Membrillo-Hernandez, 2002; Goller *et al.*, 2006; Hancock *et al.*, 2011; Kawarai *et al.*, 2009; Naves *et al.*, 2008a; Reisner *et al.*, 2006; Shimazaki *et al.*, 2012). Ainsi, la capacité d'une souche à produire du biofilm dans un milieu ne permet pas de prédire sa formation dans un autre milieu (Reisner *et al.*, 2006). Le taux de formation de biofilm serait plus élevé dans les milieux pauvres en nutriments que dans les milieux riches (Naves *et al.*, 2008a; Reisner *et al.*, 2006). Nous avons testé deux milieux de

cultures différents, très utilisés dans les laboratoires de Bactériologie : le milieu BHI et le milieu LB, qui sont des milieux riches tous les deux. Il aurait été intéressant de tester également un milieu pauvre, comme le milieu M63 pour lequel certaines études ont montré une production de biofilm augmentée, mais nous n'avons pas pu nous en procurer (Naves, 2008a). En milieu LB, une augmentation de la production de biofilm a été observée pour toutes nos souches, à des degrés plus ou moins importants, par rapport au milieu BHI. Néanmoins, le pourcentage de souches fortement productrices de biofilms reste identique.

Nous avons ensuite testé l'impact de l'addition de glucose au milieu LB, qui est variable selon les isolats : en présence de glucose, certaines souches produisent plus de biofilm, alors que l'une de nos souches formant initialement du biofilm n'en produit plus. Dans la littérature, l'effet de l'addition de glucose est également variable. Jackson et al ont montré que la formation de biofilm est diminuée par l'addition de glucose, avec un effet aléatoire selon les souches et selon les milieux utilisés, tandis que Cerca et al ont observé un effet positif du glucose sur la formation de biofilm (Cerca & Jefferson, 2008; Jackson *et al.*, 2002).

Ainsi, les souches de *E. coli* répondent différemment aux changements de conditions de croissance. Elles utilisent probablement différentes stratégies et expriment différents gènes impliqués dans la formation de biofilm en fonction des conditions environnementales (Hancock *et al.*, 2011), peut-être dépendant de leur groupe phylogénétique (Reisner *et al.*, 2006; Skyberg *et al.*, 2007).

Dans une dernière partie, nous avons donc cherché à comprendre pourquoi certains de nos isolats, comme la souche 1958, produisent beaucoup plus de biofilm que d'autres, et ce même en faisant varier les conditions environnementales.

La mobilité liée à l'expression des flagelles a été décrite comme un facteur pouvant initier la formation du biofilm (Pratt & Kolter, 1998). Dans notre cohorte, nous n'avons pu établir de corrélation entre mobilité et production de biofilm.

Un très grand nombre de gènes ont été impliqués dans la production de biofilm chez *E. coli*. (Naves *et al.*, 2008b). Les gènes *pgaA*, *csgA* et *fimH*, codant respectivement pour le Poly- β -1,6-N-acétyl-glucosamine, la protéine CsgA constituant la sous-unité majeure des curli et la protéine FimH formant les fimbriae de type 1, sont trois des principaux gènes de virulence impliqués dans la formation des biofilms. Dans notre cohorte, les gènes *fimH* et *csgA* étaient présents chez toutes les souches comme cela a déjà été montré par certains auteurs (Bert *et al.*, 2010; Crémet *et al.*, 2012). En revanche, la prévalence du gène *pgaA* est mal connue chez les souches cliniques de *E. coli*. Dans notre étude, il était présent seulement chez 7 de nos 10

souches, mais sa présence ne semble pas corrélée à la production de biofilm *in vitro* : certaines souches produisant très peu de biofilm possèdent ce gène, alors que la souche 7148 fortement productrice ne le possède pas.

Toutefois, la présence d'un gène ne présage pas de son niveau d'expression. C'est pourquoi nous avons souhaité étudier par des techniques de RT-PCR les ARNm spécifiques de ces différents gènes. Là encore, nous avons échoué à établir une corrélation entre l'expression de certains gènes et les phénotypes observés.

De plus, nous avons réalisé cette expérience de RT-PCR à partir de culture bactérienne en milieu liquide, c'est-à-dire sur des bactéries planctoniques. Il faudrait probablement extraire les ARN directement du biofilm, mais cela nécessiterait des mises au point beaucoup plus compliquées.

Nos résultats restent donc très préliminaires, mais confirment tout de même la grande variabilité de la production de biofilm *in vitro* par des isolats cliniques indépendants, l'impact des modifications de conditions environnementales, et la très grande complexité des mécanismes impliqués, qui peuvent être différents d'une souche à l'autre en fonction de son patrimoine génétique.

Bien entendu, et bien que ces techniques *in vitro* soient très largement utilisées, une question fondamentale demeure : existe-t-il une corrélation entre ce qui est observé *in vitro* (en microplaque) et ce qui se passe *in vivo*, au contact d'une sonde ou d'une prothèse ? L'approfondissement des connaissances dans ce domaine passe sans doute par la mise au point de modèles animaux, dont on connaît la complexité.

CONCLUSION

Il est désormais reconnu que la formation de biofilm à la surface des dispositifs médicaux implantables comme les cathéters, les valves cardiaques, les sondes urinaires ou encore les prothèses articulaires constitue l'élément clé de la pathogénèse des infections sur matériels. Le nombre de patients ayant recours à des dispositifs médicaux implantables est en augmentation, notamment les poses de prothèses articulaires en lien avec le vieillissement de la population. Les infections sur ces dispositifs médicaux sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité significatives. L'éradication des biofilms dans ce contexte pose des problèmes car si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils révèlent parfois une efficacité quasiment nulle sur les biofilms.

Chez *E. coli* en particulier, l'augmentation inquiétante au cours des dernières années des résistances aux antibiotiques par différents mécanismes, notamment enzymatiques (BLSE), associée à leur implantation sur des dispositifs médicaux sous forme de biofilm, pourrait conduire à des problèmes thérapeutiques considérables.

Il n'existe pas à ce jour de méthode phénotypique simple permettant de prédire la capacité d'une souche à produire du biofilm. Les méthodes en microplaques largement utilisées sont très dépendantes des conditions expérimentales, et on ignore si elles reflètent réellement les conditions rencontrées *in vivo* au contact du matériel.

Il n'existe pas non plus de méthode génotypique universelle, car la production de biofilm n'est pas associée à la présence ni à l'expression d'un seul gène, mais à des régulations génétiques très complexes mettant en jeu différents opérons, avec de probables redondances fonctionnelles des différents systèmes impliqués.

Il devient pourtant essentiel d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation des biofilms, afin de trouver de nouveaux moyens de prévenir ou de traiter les infections associées aux biofilms. Ainsi, de nouvelles molécules perturbant la formation, la maturation ou la persistance des biofilms sont étudiées. De plus, la formation de biofilm est influencée par le type de support. De façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité d'une surface et la présence de films protéiques favorisent la formation d'un biofilm. Une autre voie

de recherche est donc le développement de nouveaux matériaux réfractaires à la colonisation par les micro-organismes et à la formation de biofilm.

Dans l'attente d'un progrès radical dans la lutte contre les biofilms, leur maîtrise passe actuellement par l'association de gestes préventifs, de gestes curatifs et du choix de matériaux limitant l'adhérence.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J. L. & McLean, R. J. (1999).** Impact of rpoS deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4285-4287.
- Aulganer G. & Demoré B (2010).** Dispositifs médicaux stériles. Faculté de pharmacie de Nancy. <http://www.pharmclin.uhp-nancy.fr/demorecours%202011>
- Barnhart, M. M. & Chapman, M. R. (2006).** Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* **60**, 131-147.
- Behlau, I. & Gilmore, M. S. (2008).** Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* **126**, 1572-1581.
- Beloin, C., Roux, A. & Ghigo, J. M. (2008).** *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 249-289.
- Bergsten, G., Wullt, B. & Svanborg, C. (2005).** *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int J Med Microbiol* **295**, 487-502.
- Bert, F., Johnson, J. R., Ouattara, B., Leflon-Guibout, V., Johnston, B., Marcon, E., Valla, D., Moreau, R. & Nicolas-Chanoine, M. H. (2010).** Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* isolates causing spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in patients with cirrhosis. *J Clin Microbiol* **48**, 2709-2714.
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2011).** Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 2655-2661.
- Brady, R. A., Leid, J. G., Calhoun, J. H., Costerton, J. W. & Shirtliff, M. E. (2008).** Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 13-22.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F. (2011).** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* **27**, 1017-1032.
- Cerca, N. & Jefferson, K. K. (2008).** Effect of growth conditions on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **283**, 36-41.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hebraud, M. & Bernardi, T. (2007).** A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* **68**, 605-612.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**, 996-1006.

Collet, A., Cosette, P., Beloin, C., Ghigo, J. M., Rihouey, C., Lerouge, P., Junter, G. A. & Jouenne, T. (2008). Impact of *rpoS* deletion on the proteome of *Escherichia coli* grown planktonically and as biofilm. *J Proteome Res* **7**, 4659-4669.

Colon-Gonzalez, M., Mendez-Ortiz, M. M. & Membrillo-Hernandez, J. (2004). Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Res Microbiol* **155**, 514-521.

Corona-Izquierdo, F. P. & Membrillo-Hernandez, J. (2002). Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS). *Res Microbiol* **153**, 181-185.

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

Coenye, T. & Nelis, H. J. (2010). *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* **83**, 89-105.

Crémet, L., Corvec, S., Bemer, P., Bret, L., Lebrun, C., Lesimple, B., Miegville, AF., Reynaud, A., Lepelletier, D., Caroff, N. (2012). Orthopaedic-implant infections by *Escherichia coli*: molecular and phenotypic analysis of the causative strains. *J Infect* **64**, 169-175.

CTINILS (2007). Définition des infections associées aux soins: DGS/DHOS/Ministère de la Santé, de la Jeunesse et des Sports.

Del Pozo, J. L. & Patel, R. (2007). The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* **82**, 204-209.

Denis, F., Ploy, M.-C., Martin, C., Bingen, E. & Quentin, R. (2007a). Enterobacteriaceae, Genre *Escherichia coli*. In *Bactériologie Médicale, Techniques usuelles*, pp. 299-304. Edited by E. Masson.

Denis, F., Ploy, M.-C., Martin, C., Bingen, E. & Quentin, R. (2007b). Bacilles à Gram négatif non fermentaires, Genre *Pseudomonas*. In *Bactériologie Médicale, techniques usuelle*, pp. 330-343. Edited by E. Masson.

Dobrindt, U. (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**, 357-371.

Dobrindt, U., Chowdary, M. G., Krumbholz, G. & Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* **199**, 145-154.

- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193.
- Donlan, R. M. (2008).** Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 133-161.
- Donlan, R. M. (2011).** Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis* **52**, 1038-1045.
- EMD (2009).** Fiche signalétique du Crystal Violet: EMD Chemicals Inc.
- Erdem, A. L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J. & Giron, J. A. (2007).** Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 7426-7435.
- Espinasse, F., Page, B. & Cottard-Bouille, B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires* **426**, 51-63.
- Extremina, C. I., Costa, L., Aguiar, A. I., Peixe, L. & Fonseca, A. P. (2011).** Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods* **84**, 167-173.
- Filloux, A. & Vallet, I. (2003).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Med Sci (Paris)* **19**, 77-83.
- Francolini, I. & Donelli, G. (2010).** Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 227-238.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P. & other authors (2011).** Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* **365**, 1771-1780.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Stoodley, P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 34-40.
- Ganderton, L., Chawla, J., Winters, C., Wimpenny, J. & Stickler, D. (1992).** Scanning electron microscopy of bacterial biofilms on indwelling bladder catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**, 789-796.
- Ghigo, J. M. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445.
- Gil-Perotin, S., Ramirez, P., Marti, V., Sahuquillo, J. M., Gonzalez, E., Calleja, I., Menendez, R. & Bonastre, J. (2012).** Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit Care* **16**, R93.
- Goller, C., Wang, X., Itoh, Y. & Romeo, T. (2006).** The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates pgaABCD transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol* **188**, 8022-8032.

Guggenbichler, J. P., Assadian, O., Boeswald, M. & Kramer, A. (2011). Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* **6**, Doc18.

Hachem, R., Reitzel, R., Borne, A., Jiang, Y., Tinkey, P., Uthamanthil, R., Chandra, J., Ghannoum, M. & Raad, I. (2009). Novel antiseptic urinary catheters for prevention of urinary tract infections: correlation of in vivo and *in vitro* test results. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5145-5149.

Hahn, E., Wild, P., Hermanns, U. & other authors (2002). Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol* **323**, 845-857.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95-108.

Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**, 1034-1043.

Hancock, V., Witso, I. L. & Klemm, P. (2011). Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol* **301**, 570-576.

HAS (2005). Recommandation de bonne pratique. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge des infections dans le mois suivant l'implantation.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.

Honraet, K., Goetghebeur, E. & Nelis, H. J. (2005). Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods* **63**, 287-295.

Jackson, D. W., Simecka, J. W. & Romeo, T. (2002). Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol* **184**, 3406-3410.

Jacobsen, S. M., Stickler, D. J., Mobley, H. L. & Shirtliff, M. E. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* **21**, 26-59.

Jiang, L. M., Hoogenkamp, M. A., van der Sluis, L. W., Wesselink, P. R., Crielaard, W. & Deng, D. M. (2011). Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *J Endod* **37**, 31-35.

Jin, Y., Samaranayake, L. P., Samaranayake, Y. & Yip, H. K. (2004). Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol* **49**, 789-798.

Johnson, J. R. & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". *J Lab Clin Med* **139**, 155-162.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-140.

Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* **89**, 205-218.

Kawarai, T., Furukawa, S., Narisawa, N., Hagiwara, C., Ogihara, H. & Yamasaki, M. (2009). Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media. *J Biosci Bioeng* **107**, 630-635.

Laurent, F. (2011). Biofilm bactérien. Université de Médecine de Lyon.
http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-mai/desc_mai2011-biofilm-laurent.pdf

Lavigne, J. P., Bourg, G., Combescure, C., Botto, H. & Sotto, A. (2008). In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial Vaccinium macrocarpon (cranberry) capsules. *Clin Microbiol Infect* **14**, 350-355.

Le Bouguenec, C. (2005). Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**, 471-478.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 999-1007.

Muzzi-Bjornson, L. & Macera, L. (2011). Preventing infection in elders with long-term indwelling urinary catheters. *J Am Acad Nurse Pract* **23**, 127-134.

Nagant, C., Tre-Hardy, M., Devleeschouwer, M. & Dehay, J. P. (2010). Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *J Microbiol Methods* **82**, 243-248.

Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodriguez-Cerrato, V., Ponte, M. C. & Soriano, F. (2008a). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* **105**, 585-590.

Naves, P., del Prado, G., Huelves, L. & other authors (2008b). Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog* **45**, 86-91.

Nett, J. & Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* **9**, 340-345.

Nett, J. E., Lepak, A. J., Marchillo, K. & Andes, D. R. (2009). Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *J Infect Dis* **200**, 307-313.

Nicolle, L. E. (2005). Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging* **22**, 627-639.

Oliveira, A. & Cunha Mde, L. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* **3**, 260.

- Otto, M. (2008).** Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 207-228.
- Parsek, M. R. & Singh, P. K. (2003).** Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **57**, 677-701.
- Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2008).** Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72**, 157-165.
- Pettit, R. K., Weber, C. A., Kean, M. J., Hoffmann, H., Pettit, G. R., Tan, R., Franks, K. S. & Horton, M. L. (2005).** Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2612-2617.
- Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley, F. L., Jr., Mowat, E., Ramage, G. & Lopez-Ribot, J. L. (2008).** A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc* **3**, 1494-1500.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285-293.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P. & Dorel, C. (2000).** Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**, 450-464.
- Punithavathy, P. M., Nalina, K. & Menon, T. (2012).** Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian J Pathol Microbiol* **55**, 72-74.
- Reisner, A., Krogfelt, K. A., Klein, B. M., Zechner, E. L. & Molin, S. (2006).** *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol* **188**, 3572-3581.
- Rodriguez-Martinez, J. M., Ballesta, S. & Pascual, A. (2007).** Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **30**, 366-368.
- Saldana, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L. & Giron, J. A. (2009).** Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol* **11**, 992-1006.
- Sandberg, M. E., Schellmann, D., Brunhofer, G., Erker, T., Busygin, I., Leino, R., Vuorela, P. M. & Fallarero, A. (2009).** Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J Microbiol Methods* **78**, 104-106.
- SFAR (1999).** Recommandations pour la pratique de l'antibioprophylaxie en chirurgie, actualisation de la conférence de consensus de Décembre 1992.

- SFHH & HAS (2005).** Prévention des infections liées aux cathéters veineux périphériques.
- SFM (2010a).** Diagnostic microbiologique des infections urinaires. In *Rémic*, pp. 81-92. Edited by Société Française de Microbiologie.
- SFM (2010b).** Diagnostic des infections microbiennes liées à un dispositif intra-vasculaire. In *Rémic*, pp. 69-72. Edited by Société Française de Microbiologie.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D. & Nataro, J. P. (2001).** Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**, 983-997.
- Shimazaki, J., Furukawa, S., Ogihara, H. & Morinaga, Y. (2012).** L-Tryptophan prevents *Escherichia coli* biofilm formation and triggers biofilm degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **419**, 715-718.
- Simoës, M. (2011).** Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Curr Med Chem* **18**, 2129-2145.
- Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. (2010).** Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* **65**, 1955-1958.
- Skyberg, J. A., Siek, K. E., Doetkott, C. & Nolan, L. K. (2007).** Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J Appl Microbiol* **102**, 548-554.
- Snaterse, M., Ruger, W., Scholte Op Reimer, W. J. & Lucas, C. (2010).** Antibiotic-based catheter lock solutions for prevention of catheter-related bloodstream infection: a systematic review of randomised controlled trials. *J Hosp Infect* **75**, 1-11.
- SPILF & AFU (2002).** Conférence de consensus: Infections urinaires nosocomiales (texte court).
- SPILF (2009).** Recommandations de pratique clinique: Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéosynthèse) (texte court).
- Stepanovic, S., Djukic, N., Djordjevic, V. & Djukic, S. (2003).** Influence of the incubation atmosphere on the production of biofilm by staphylococci. *Clin Microbiol Infect* **9**, 955-958.
- Stewart, P. S. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**, 107-113.
- Stickler, D. J. (2008).** Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol* **5**, 598-608.
- Tenke, P., Kovacs, B., Jackel, M. & Nagy, E. (2006).** The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* **24**, 13-20.

- Tolker-Nielsen, T. & Molin, S. (2000).** Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol* **40**, 75-84.
- Tote, K., Vanden Berghe, D., Maes, L. & Cos, P. (2008).** A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol* **46**, 249-254.
- Trautner, B. W. & Darouiche, R. O. (2004a).** Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Arch Intern Med* **164**, 842-850.
- Trautner, B. W. & Darouiche, R. O. (2004b).** Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control* **32**, 177-183.
- Ursic, V., Tomic, V. & Kosnik, M. (2008).** Effect of different incubation atmospheres on the production of biofilm in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) grown in nutrient-limited medium. *Curr Microbiol* **57**, 386-390.
- Van Houdt, R. & Michiels, C. W. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* **156**, 626-633.
- Zhang, L., Gowardman, J. & Rickard, C. M. (2011).** Impact of microbial attachment on intravascular catheter-related infections. *Int J Antimicrob Agents* **38**, 9-15.
- Zheng, Z. & Stewart, P. S. (2002).** Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 900-903.

Auger Myriam

Titre du mémoire de thèse : Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques de *Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales.

Résumé du mémoire de thèse :

Les biofilms, communautés structurées de micro-organismes fixées à une surface, semblent être l'élément clé de nombreuses infections. Le biofilm formé par *E. coli* est notamment impliqué dans les infections sur sonde urinaire ou sur matériel ostéo-articulaire. De nombreux facteurs de virulence sont connus pour avoir un rôle dans la formation de ces biofilms par *E. coli*, mais la compréhension de ce phénomène reste incomplète. Plusieurs méthodes d'étude des biofilms *in vitro* existent. La méthode au Crystal Violet est la plus utilisée dans la littérature. L'objectif principal de notre étude était d'évaluer *in vitro* dans différentes conditions expérimentales la formation de biofilm par 10 souches cliniques de *E. coli* isolées au laboratoire de Bactériologie du CHU de Nantes. Nous avons pu observer une grande diversité dans la capacité des souches cliniques à former du biofilm, dans des conditions définies. Par ailleurs, la formation de biofilm varie pour une souche donnée en fonction des conditions expérimentales (milieu de culture, conditions d'oxygénation). Les souches ne répondent pas toutes de la même manière aux variations des conditions de croissance. Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si la présence ou l'expression de certains gènes pourrait être associée à des souches cliniques fortement productrices de biofilm. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués pourrait améliorer les moyens de lutte contre les biofilms.

Mots clés : **ESCHERICHIA COLI, BIOFILM**

Jury :

Président : **Monsieur le Pr. Patrice LE PAPE**, Professeur de Parasitologie et de Mycologie – Faculté de Pharmacie – Nantes

Assesseurs : **Monsieur le Pr. Eric BATARD**, Professeur de Thérapeutique – Faculté de Médecine – Nantes

Monsieur le Dr. Stéphane CORVEC, Maître de conférences de Bactériologie – Faculté de Médecine – Nantes

Madame le Dr. Nathalie CAROFF, Maître de conférences de Bactériologie – Faculté de Pharmacie – Nantes
