

**Université de M'sila**  
**Faculté des Sciences**  
**Département de Biochimie et Microbiologie**  
**1<sup>ère</sup> année Master Microbiologie**  
**Module d' Interaction Microbienne**  
**Responsable du module**  
**Boubekeur. H**

## **Chapitre I**

### **STRUCTURE DES BIOFILMS**

Dans les conditions naturelles, les bactéries existent sous deux formes :

- libre: mode de flottaison libre appelé forme planctonique,
- sessile : attaché, sous forme de biofilm.

Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe. La forme planctonique permet aux bactéries de proliférer et de coloniser de nouvelles niches. C'est la forme minoritaire. Brièvement, des bactéries sous forme libre s'attachent à une surface de façon irréversible, puis croissent. Ces bactéries produisent et accumulent des polymères extracellulaires, formant une matrice extracellulaire à forte teneur en eau. Les bactéries sont immobilisées au sein de cette matrice. Leur proximité entre elles leur permet de réaliser des échanges de signaux et de nutriments. C'est cet ensemble qui forme le biofilm

Ce mode de vie permet à des colonies de bactéries de persister à un endroit donné, sans proliférer. Il confère à la communauté bactérienne une véritable protection contre un certain nombre de stress environnementaux comme la dessiccation ou encore l'action d'agents antimicrobiens. Un biofilm a la capacité de devenir résistant aux réponses immunitaires innée et acquise de l'hôte. Les traitements antimicrobiens à des concentrations classiques d'utilisation ne permettent pas l'éradication des biofilms. L'étude de la structure des biofilms et des mécanismes de leur dynamique de formation a donc un intérêt dans la recherche concernant les moyens de lutte contre les biofilms.

#### **2.1. Une grande diversité de biofilms**

Le terme de biofilm pourrait laisser entendre qu'il s'agit d'une simple couche de micro organismes déposée sur une surface. Les biofilms sont très hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Ils sont constamment remodelés, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes. Ils présentent une grande diversité aussi bien au niveau structural

(une ou plusieurs espèces de micro-organismes au sein du biofilm, épaisseurs diverses) qu'au niveau des supports colonisés.

Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes . La plupart des biofilms rencontrés sont hétérogènes. La présence d'une espèce de micro-organisme ou d'une autre au sein du biofilm dépend des conditions environnementales.

Par exemple, les biofilms éclairés par la lumière du soleil sont composés majoritairement d'organismes phototrophes, comme les algues ou les cyanobactéries, réalisant la photosynthèse et produisant leur biomasse à partir de carbone minéral. Les biofilms formés en absence de lumière sont constitués principalement de bactéries hétérotrophes (dégradation de la matière organique) et chimiotrophes (transformation de substances minérales) Les biofilms peuvent se former sur des surfaces, biologiques ou inertes, d'une grande diversité: tissus vivants, appareillage médical (sonde, cathéter, broches...), système de canalisation industriel ou d'eau potable, surfaces immergées. Les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm.

Selon le type de support sur lequel se forme le biofilm, l'organisation structurale de ce dernier sera différente. Un biofilm fixé dans la lumière d'une canalisation a une structure très complexe, et contient divers composants : produits issus de réactions de corrosion, boue, algues unicellulaires et bactéries filamenteuses. Un biofilm formé à la surface d'un cathéter a une organisation plus simple : on distingue des micro-colonies de coques associées à une matrice d'exopolymères .

Tous les biofilms n'ont pas la même épaisseur. Les biofilms des eaux naturelles oligotrophes sont plus fins que ceux des milieux aqueux riches comme la plaque dentaire ou les cathéters. Les biofilms récemment formés sont souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens qui sont stratifiés.

L'architecture du biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms. De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes.

## **2.2. Une organisation structurale commune**

Les biofilms sont hétérogènes d'un point de vue structural. Ils se forment sur des supports variés, ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de micro-organismes. De cette diversité on peut néanmoins dégager certaines caractéristiques structurales communes à tous les biofilms. Un biofilm est constituée d'une fine monocouche de cellules à sa base (fixées à la surface du substrat), surmontée de plusieurs couches épaisses de cellules enfermées dans une matrice et reliées par des canaux aqueux. Il s'agit d'une organisation spatiale stratifiée, permettant des échanges (informations, nutriments...) et une coopération entre micro-organismes.

### **2.2.1. Une organisation stratifiée**

La couche la plus profonde du biofilm est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente. La couche superficielle du biofilm est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide. Entre ces deux couches de cellules, on trouve des cellules en micro aérobiose. L'organisation stratifiée des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments, d'ions... Les nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grande quantité dans les couches superficielles du biofilm. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses. Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des micro-organismes. Des simulations tridimensionnelles réalisées par informatique ont permis de montrer que les zones de croissance rapide du biofilm sont caractérisées par la présence de larges structures en colonnes contrairement aux zones de croissance réduite où l'on trouve un réseau étroit de structures entraînant ainsi une réduction des communications intercellulaires et de la croissance du biofilm.

Au sein du biofilm, les micro-organismes morts ou lysés sont réutilisés comme nutriments : on parle de « cannibalisme ». L'ADN libéré lors de la mort programmée de certains micro-organismes du biofilm aurait un rôle structural dans la stabilité des biofilms.

### **2.2.2. Les principaux constituants du biofilm : les bactéries et la matrice d'exopolysaccharides**

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. L'eau est leur principal composant, ce qui explique leur propriété hydrophile. La présence de canaux et de pores permet des flux d'eau, d'ions et de nutriments

Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm. La matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique carbonée d'un biofilm. Le rapport C/N d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice. La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural important, et explique certains avantages permis par le mode de vie sessile, notamment la protection des micro-organismes contre les facteurs environnementaux et d'autres propriétés comme la résistance aux agents bactéricides.

Les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolysaccharides sont variables d'un biofilm à l'autre. Elle est toujours initialement composée de polysaccharides. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel. Parfois, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée. La matrice d'exopolysaccharides joue aussi un rôle mineur dans les propriétés d'antibiorésistance des biofilms en se liant directement aux agents anti-microbiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm. Ainsi, la matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de barrière protectrice contre la dessiccation, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages.

### **2.3. Observation de biofilms**

Les méthodes d'études actuelles des biofilms permettent d'en obtenir des images. Leur visualisation permet de mieux se rendre compte de la réalité et de la complexité de la structure des biofilms. Par exemple, par microscopie confocale à balayage laser, associée à des techniques de mesure par des microélectrodes, on observe des conglomerats cellulaires emprisonnés dans une importante matrice extracellulaire à forte teneur en eau, avec des formes diverses : piliers cylindriques ou filaments évoquant une structure en forme de tulipe, de coraux ou de champignons. Cette irrégularité structurale s'explique par la présence d'une multitude de pores et de canaux. Cette organisation tridimensionnelle particulière permet une protection optimale des individus formant le biofilm.

La structure des biofilms est relativement hétérogène mais des propriétés architecturales communes existent. Il s'agit de conglomerats cellulaires agrégés dans une matrice d'exopolysaccharides. Les biofilms sont traversés d'une multitude de pores et de canaux permettant des échanges d'information, des flux d'eau, mais aussi des transports de nutriments et de déchets. On peut parler d'écologie du biofilm

### **3. FORMATION ET ECOLOGIE DES BIOFILMS**

La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des micro-organismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile, est un processus dynamique et complexe. Il est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotypes des micro-organismes concernés : les mêmes individus ne possèdent plus les mêmes propriétés ni les mêmes fonctions. L'environnement particulier du biofilm permet aux cellules de coopérer et d'interagir de manière différente que sous forme planctonique. Ainsi, les bactéries vivant en biofilm ont des propriétés sensiblement différentes de celles des bactéries planctoniques de la même espèce. L'activation de nombreux groupes de gènes en quelques minutes régule cette permutation de mode de vie. Les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie commencent tout juste à être identifiés et compris). Les micro-organismes d'un biofilm disposent de mécanismes originaux pour s'attacher de façon réversible à une surface, y adhérer et former une communauté. Un véritable écosystème va se former, puis se détacher sous l'influence de divers facteurs environnementaux.

Les moyens utilisés par les bactéries pour former des biofilms diffèrent selon les espèces considérées, mais on peut définir trois propriétés communes à tous les biofilms :

- Les cellules constituant le biofilm sont reliées entre elles par une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques,
- Le développement d'un biofilm est sous l'influence de signaux extracellulaires (environnementaux) et cellulaires (notion de quorum sensing),
- Le biofilm protège les bactéries qui le constituent de l'action des agents anti-microbiens, des défenses immunitaires de l'hôte et d'éventuels prédateurs. On va tout d'abord s'intéresser aux différentes étapes de formation d'un biofilm.

### **3.1. Les étapes de formation d'un biofilm**

On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms (figure.1)

Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon réversible par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on parle d'adhérence. Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pili, et synthétisent une matrice d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'adhésion. On distingue ensuite des phases de croissance et de maturation du biofilm. Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm, et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle d'essaimage du biofilm.

#### **3.1.1. Attachement primaire réversible et non spécifique à une surface (adhérence)**

L'interface solide-liquide entre une surface et un milieu aqueux (eau, sang par exemple), fournit un environnement idéal pour la fixation de micro-organismes et la formation d'un biofilm. Dans un environnement liquide, les bactéries sont soumises à des forces hydrodynamiques lorsqu'elles s'approchent d'une surface. Les bactéries ont développé des mécanismes de motilité active afin de contrer les forces répulsives et électrostatiques rencontrées au voisinage des surfaces sur lesquelles elles se fixent. Par exemple, les bactéries Gram-négatives, comme *Escherichia coli* ou *Salmonella*, possèdent des flagelles. Ces derniers leur permettent d'entrer en contact avec une surface puis de s'y fixer.

Cependant, la motilité flagellaire n'est pas essentielle pour l'attachement initial et la formation d'un biofilm. L'absence de flagelle est compensée par l'existence d'autres molécules adhésives, comme les curli, permettant l'attachement de la bactérie à la surface. Certaines bactéries sont capables d'établir un contact avec une surface par des mécanismes de signalisation et d'exprimer par la suite des adhésines à leur surface. Ce mécanisme est appelé « surface sensing ». Il existe chez *Escherichia coli*, (système de signalisation Cpx) mais les modes de fonctionnement ne sont pas encore connus. Les gènes codant pour les caractères de motilité (synthèse du flagelle, motilité, chimiotactisme) sont inhibés une fois que les bactéries se sont fixées à la surface.

L'attachement primaire à une surface est sous l'influence de nombreux facteurs : pH, osmolarité du milieu, température.... Il est suivi par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface.

### **3.1.2. Attachement secondaire irréversible et spécifique à une surface (adhésion)**

#### **Mécanismes d'adhésion.**

L'adhésion correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface. Les structures d'adhésion varient selon les types de micro-organismes concernés. Pour les bactéries Gram-négatives, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries Gram-positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivant presque uniquement fixées (comme par exemple *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*) utilisent des structures spécifiques comme le pédoncule ou la gaine.

Ces molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts cellule-surface et des contacts cellule-cellule. Chez certaines souches de streptocoques, des protéines exprimés à la surface des bactéries, entre autres la protéine Bap, favorisent les contacts entre cellules et contribuent à la synthèse de la matrice extracellulaire.

#### **Molécules impliquées.**

Les fimbriae de type I, ou pili, sont rencontrées chez la plupart des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Citrobacter* et *Enterobacter* par exemple). Elles interviennent dans la colonisation de tissus vivants et dans la formation de biofilms. La protéine adhésive FimH exprimée par les fimbriae de type I peut se lier à des glycoprotéines, comme par exemple les uroplakines des cellules uroépithéliales vésicales, les IgA ou encore les mucines pulmonaires et intestinales. La production de fimbriae de type I est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules et les conditions environnementales. Les bactéries exprimant ce type d'organelles en expriment en moyenne 100 à 500 à leur surface.

Les curli sont des fibres protéiques extracellulaires produites par des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae. Les curli peuvent se fixer à des protéines de la matrice extracellulaire des cellules de l'hôte : fibronectine, laminine, plasminogène. Leur synthèse est sous l'influence de nombreuses conditions environnementales comme la température, l'osmolarité, le pH et les concentrations en oxygène. Les curli ont un rôle dans l'adhésion et la colonisation d'une surface et la formation de biofilms. L'aptitude de souches environnementales d'*Escherichia coli* à former des biofilms dépend de leur capacité à exprimer des curli à leur surface.

Les pili de conjugaison interviennent lors du contact initial avec la surface et lors de la phase de maturation du biofilm. Ils joueraient un rôle de stabilisation dans la structure du biofilm. L'utilisation des pili de conjugaison met un terme à une mobilité désorganisée des bactéries et permet des interactions stables. Dès lors, l'attachement devient irréversible.

Certaines bactéries expriment à leur surface des molécules spécifiques intervenant lors de leur fixation à un substrat, différentes des molécules d'adhésion fréquemment rencontrées et citées précédemment. Prenons l'exemple des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infections du tractus urinaires suite à la colonisation de sondes urinaires.

Soixante pour-cent des souches uro-pathogènes d'*Escherichia coli* expriment à leur surface une adhésine appelée Ag43. Il s'agit d'un facteur protéique intervenant dans les phénomènes d'auto-aggrégation cellulaire. Cet épitope confère aux bactéries qui en sont porteuses la capacité de « s'auto-aggréger ». Ag43 intervient dans les contacts cellule-substrat et cellule-cellule et est exprimée de façon importante durant le mode de vie sous forme de biofilms.

### **3.1.3. Phases précoces de développement du biofilm. Maturation du biofilm.**

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation. La maturation du biofilm est divisée en deux phases. La première phase est marquée par des régulations de gènes importantes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elles concernent essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support. La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm.

L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation. Soixante-dix gènes subiraient des modifications au cours de la maturation d'un biofilm.

### **3.1.4. Essaimage et dispersion du biofilm**

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion: des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm. Des remaniements génétiques sont à l'origine du détachement des formes planctoniques. Ce dernier permet non seulement de



promouvoir une diversité génétique mais aussi de favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms. La libération des formes planctoniques à partir du biofilm peut se faire selon deux modalités. Les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités :

on parle d' « érosion » du biofilm. Mais on peut assister à un détachement massif et rapide, « en lambeaux », de quantités importantes de bactéries, appelé « sloughing ».

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance. En effet, les bactéries planctoniques essaimant d'un biofilm sont capables de résister aux défenses immunes de l'hôte et être à l'origine d'une infection. Par exemple, les bactéries planctoniques qui essaient à partir de prothèses et d'implants médicaux sont capables de survivre à la phagocytose réalisée par les polynucléaires neutrophiles et d'engendrer une infection systémique.



Figure 1. Étapes du développement d'un biofilm sur une surface dure. Étape 1 : attachement initial ; étape 2 : attachement irréversible ; étape 3 : apparition et « maturation I » du biofilm ; étape 4 : maturation II ; étape 5 : érosion et dispersion/Détachement autogène

### 3.2. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules.

### **3.2.1. Caractéristiques de la surface**

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

#### **Rugosité de la surface.**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro colonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités. Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques.

#### **Propriétés physico-chimiques de la surface.**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outre passer les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaisons hydrophobes.

#### **Présence de films protéiques sur la surface.**

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

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

implants médicaux en contact direct avec un fluide favorisent la formation de biofilms. Par exemple, les cathéters veineux centraux, en contact direct avec le sang, sont recouverts de plaquettes, de plasma et de protéines: albumine, fibrinogène, fibronectine, laminine.

L'attachement à une matrice protéique est la première étape de formation d'un biofilm dans le corps humain. Par exemple, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* expriment à leur surface des molécules, « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule », capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine. Ces interactions spécifiques entre matrice protéique de l'hôte et MSCRAMM sont très importantes pour l'établissement de la colonisation bactérienne.

### **3.2.2. Caractéristiques du milieu**

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs. On peut citer les facteurs suivants

- Température,
- pH: conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité
- Concentration en oxygène,
- Concentration en fer,
- Osmolarité,
- Présence d'ions spécifiques,
- Sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation,
- Concentrations en nutriments: dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique,
- Concentrations en certains cations: l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na<sup>+</sup>, Calcium Ca<sup>2+</sup>, ion ferrique Fe<sup>3+</sup>) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre,
- Hydrodynamique du fluide: selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus

facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide,

- Saison : il existerait un effet saisonnier sur la formation de biofilms,

La formation d'un biofilm dépend, selon les bactéries, de conditions environnementales différentes. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* peut former des biofilms dans n'importe quelles conditions alors que d'autres bactéries nécessitent des conditions particulières de température, de pH ou encore de nutrition. Certaines bactéries peuvent s'adapter à des milieux par des modifications génétiques.

Des conditions environnementales stressantes (fortes concentrations de sels, de sucres, d'alcools, hautes températures, variations extrêmes du pH) inhibent la biosynthèse du flagelle.

### 3.3. Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm

Les mécanismes d'attachement et de détachement d'un biofilm sont étroitement liés puisque les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement. Plusieurs facteurs peuvent induire le détachement du biofilm et l'essaimage de bactéries sous forme planctonique, permettant ainsi la colonisation d'autres sites. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- l'action mécanique exercée par un flux de liquide, par exemple au sein d'une vessie ;
- l'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple,
- la lyse de cellules du biofilm par l'action d'un phage, d'EDTA, de NaCl, de CaCl<sub>2</sub>, ou encore d'agents chélateurs,

l'action de facteurs de détachements : surfactants ou enzymes dégradant la matrice

La dispersion d'un biofilm peut aussi être initiée par des changements environnementaux : limitation en oxygène ou en nutriments, modification du pH ou présence de certains composés spécifiques. La dispersion des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* est la plus étudiée. Pour ces derniers, une augmentation de la concentration en carbone, citrate, glutamate ou glucose, entraîne un détachement massif de plus de 80% des cellules constituant le biofilm.

Les conditions environnementales, notamment la privation en oxygène, jouent un rôle très important dans le déclenchement de la dispersion des biofilms. Des biofilms de *Shewanella*

*oneidensis* ont été créés in vitro puis soumis 14 heures après leur formation à une privation en oxygène. On a pu observer un détachement massif et immédiat, avec 50 à 80% des cellules qui se sont détachées du biofilm durant les 15 premières minutes d'hypoxie. Ce type de détachement diminue avec l'âge et l'épaisseur du biofilm ; au bout de 48 heures le phénotype du biofilm est modifié, et il devient irréversiblement fixé.

Au sein d'un biofilm, les bactéries vivent en communauté, sont fixées à un support, et interagissent. On peut ainsi parler d'« écologie du biofilm ».

### **3.4. Ecologie d'un biofilm**

On distingue différents types d'interactions qui ont des effets positifs ou négatifs pour les membres de la communauté bactérienne. On peut citer comme exemple bénéfique la coopération dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes, ou encore la production d'enzymes profitables à l'ensemble de la communauté de micro-organismes. A l'opposé, les différentes colonies de micro-organismes occupant une même niche écologique entrent en compétition pour l'acquisition des ressources se trouvant dans le milieu. Deux mécanismes de compétition entre bactéries est la production de bactériocines et la baisse du pH.

Les biofilms ont une architecture complexe et irrégulière, en forme de coraux ou de champignons. Cette architecture n'est pas figée: les micro-organismes bougent à partir du lieu de leurs premières divisions cellulaires : il y a une véritable dynamique interne au sein des biofilms (Clutterbuck, 2007). Les micro-colonies de bactéries sont imbriquées au sein d'une matrice d'exopolymères contenant des canaux aqueux et de spores, permettant des échanges d'eau, de nutriments, de déchets, mais aussi d'information et de caractères transmissibles génétiquement (caractères de résistance aux antibiotiques par exemple). L'échange de plasmides au sein des biofilms se fait par des phénomènes de conjugaison. Ainsi, l'organisation en biofilm permet de sélectionner et de répandre des caractères de résistance à des agents antimicrobiens. Dans les régions inaccessibles à ces canaux, par exemple au sein des agglomérats de cellules, des mécanismes de diffusion passive assurent les échanges métaboliques. La diffusion des nutriments se fait de façon inégale au sein du biofilm, suite à l'existence de gradients. Ceci explique que toutes les cellules n'ont pas la même activité métabolique et donc pas la même vitesse de croissance.

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « quorum sensing », jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms.