

Institut des Sciences et de Technologie Département des Sciences de la Nature et de la
Vie Laboratoire de recherche :
Gestion durable des ressources naturelles dans les zones arides et semi-aride

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER académique

En Sciences Biologiques Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté Par :

KHACHAI Amel

SELLAMI Salima

Thème

Etude comparative de l'adhésion des biofilms microbiens sur deux surfaces similaire à celles de téléphone mobile

Soutenu le : 29/06/2022

Devant le jury :

Présidente : LAGHA Nouria

MCA, Centre Universitaire De Naâma

Examineur : Mahdad Yassine Moustafa

MCA, Centre Universitaire De Naâma

Encadreur : SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib

Pr, Centre Universitaire De Naâma

Co-Encadreur : AISSAOUI Nadia

MCA, Centre Universitaire De Naâma

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

A ALLAH Tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce modeste travail. Qui m'a guidé dans le bon chemin. Je te dois ce que je suis devenu. Merci et gratitude pour votre miséricorde et votre gentillesse. Vous êtes O Rahman, O Rahim.

A notre encadrant Monsieur **Seddiki Sidi Mohammed Lahbib**, Professeur au CUN. Vous étiez la base de ce travail, sans vos encouragements, votre gentillesse, précieux conseils, votre aide et corrections, ce travail n'aurait pas été achevé.

Nos remerciements vont également à **Mme Aissaoui nadia**, co-encadrant pour son aide.

Au Docteur **Lagha Nouria**. Nous vous exprimons nos remerciements, notre reconnaissance et notre gratitude pour avoir accepté de présider le jury. Merci pour vos connaissances scientifiques.

Au Docteur **Mahdad Yassine Moustafa**, nous vous remercions de votre contribution et de votre présence au sein du jury, et de votre accord pour examiner et discuter ce modeste travail. Nous remercions tous les ingénieurs de laboratoire microbiologie du CUN, en particulier **Mme Benatta Fatima, souhila Haddi** qui nous ont accompagné depuis le début des travaux.





Dédicace

Je dédie ce travail à

Mes très chers parents **Mohammed** et **Talia** à leur encouragement, pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Que Dieu te donne la santé et longue vie.

A mon deuxième père **Acher kada**, je te remercie d'avoir été à mes côtés, pour tes encouragements, et de m'avoir hébergé tout ce temps.

Mes chères sœurs **Fatima, Halima, Houda et Atika**.

Mes chers frères **Nourdine et Omar**.

A mon binôme de ce mémoire **Amel Khachai** qui a partagé avec moi les moments de ce travail.

A Toutes mes amies sans exception.

Salima



Dédicace

Je dédie ce travail à

Celui qui est exemplaire en force, patience et réussite, à celui que j'ai tant aimé et que

j'aimera toujours, mon cher père **Mohammed**.

À celle qui m'a donné tant d'amour et de tendresse, à celle qui illumine chaque jour ma

matinée, ma chère maman **Aicha**

A mes deux chères sœurs : **Fatima et Nadjet**.

A mes chers frères : **Abdelkader, Ahmed, Boutkhile et Habib**.

A tous mes amis proches (**khouloude, Fatna, Fatima, Ikram, zoubida, Zahia, Hanan**) qui

m'ont soutenu aussi A mes chers collègues avec qui j'ai passé les meilleures périodes d'études,

en particulier mon binôme **Sellami Salima**.

Amel. Kh

ملخص :

يمكن أن تكون الهواتف المحمولة لموظفي الرعاية الصحية في المستشفيات ملوثة، وبالتالي تعتبر مستودعات للكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض. تميل البكتيريا بشكل طبيعي إلى الالتصاق بالدعم وتشكيل الأغشية الحيوية. تهدف هذه الدراسة إلى دراسة الالتصاق الميكروبي على الأسطح المشابهة لتلك الموجودة في الهواتف المحمولة، الزجاج والبلاستيك. تم استخدام 25 سلالة معزولة سابقاً من هذا النوع من المواد في مستشفى النعمة. تم تقييم تكوين الأغشية الحيوية وفقاً لطريقة (O'Toole et al. (2000، والتي تعتمد على تلطيخ الأغشية الحيوية باللون البنفسجي البلوري. تم تقييم اختبار نفاذية السطح البكتيرية باستخدام تقنية MATS. أخيراً، تم إجراء التجميع الذاتي وفقاً للطريقة الموصوفة بواسطة (Del Re et al. (2000، وهو يعتمد على قياس الامتصاصية. تم إجراء المراقبة المجهرية أيضاً تحت مجهر الفلوري. تم تمييز ثلاث مجموعات من السلالات، أولها يتعلق بالسلالات التي تشكل أغشية حيوية بقوة، والثانية بالنسبة لتلك التي تتكون بشكل معتدل، وأخيراً تلك التي تكون ضعيفة إنتاج الأغشية الحيوية. وبالمثل، أوضحت النتائج التي تم الحصول عليها أن أكثر من نصف (52٪) السلالات المستخدمة تمثل قدرة كارهة للماء، علاوة على أن 36٪ من السلالات تمثل احتمالاً نسبياً للكارهة للماء. بالنسبة لاختبار التجميع الذاتي، أظهر أكثر من نصف السلالات قوة أكبر من 50٪. وفقاً للاختبارات الإحصائية، تم تسجيل علاقة إيجابية كبيرة بين قوة تشكيل الأغشية الحيوية والكراهية للماء لأسطح الخلايا. بالإضافة إلى ذلك، أظهر الفحص المجهر الفلوري أن الدعامة الزجاجية كانت مناسبة للالتصاق البكتيري، أكثر من البلاستيك.

الكلمات المفتاحية : الأغشية الحيوية، التصاق، تجميع ذاتي، رهاب الماء، دعامة

Résumé

Les téléphones portables du personnel soignant dans les milieux hospitaliers peuvent être contaminés et, par conséquent, considérés comme des réservoirs de microorganismes pathogènes. Les bactéries ont une tendance naturelle à l'adhésion à un support et former les biofilms. Cette étude vise l'étude de l'adhésion microbienne sur les surfaces similaires à celles du téléphone portable, le verre et le plastique. 25 souches, préalablement isolées à partir de ce type de matériel dans l'EPH Naâma, ont été utilisées. La formation des biofilms a été évaluée selon la méthode de O'Toole et al., (2000), celle-ci repose sur la coloration des biofilms par le cristal violet. Le test de l'hydrophobicité des surfaces bactériennes a été évalué selon la technique MATS. En fin, l'auto-agrégation a été effectuée selon la méthode décrite par Del Re et al., (2000), elle se base sur la mesure de l'absorbance. L'observation microscopique a été également réalisée sous un microscope épi-fluorescent. Trois groupes de souches ont été distingués, le premier concerne les souches fortement formatrices de biofilms, le secondaire pour les moyennement formatrices et enfin, celles faiblement biofilmogènes. De même les résultats obtenus ont révélé que plus de la moitié (52%) des souches utilisées ont présenté un potentiel hydrophobe, de plus 36% souche ont présenté un potentiel relativement hydrophobe. Pour le test de l'auto-agrégation, plus de la moitié des souches avaient présenté un pouvoir supérieur à 50%.

Selon les tests statistiques, une corrélation significativement positive a été enregistrée entre le pouvoir de formation de biofilms et l'hydrophobicité des surfaces cellulaires. Par ailleurs, la microscopie épi fluorescente a révélé que le support verre était approprié à l'adhésion bactérienne, plus que celui en plastique.

Mots clés : Biofilm, Adhésion, Auto agrégation, Hydrophobie, support.

Abstract

Mobile phones of health care workers in hospital settings may be contaminated and therefore considered as reservoirs of pathogenic microorganisms. Bacteria have a natural tendency to adhere to a medium and form biofilms. This study aims to study microbial adhesion on surfaces similar to those of mobile phones, glass and plastic. 25 strains, previously isolated from this type of material in the EPH Naâma, were used. Biofilm formation was evaluated using the method of **O'Toole et al., (2000)**, which is based on the staining of the biofilms by the violet crystal. The test for the hydrophobicity of bacterial surfaces was evaluated using the MATS technique. Finally, self-aggregation was carried out according to the method described by **Del Re et al., (2000)** and is based on the absorbance measurement. Microscopic observation was also performed under an epi-fluorescent microscope. Three groups of strains have been distinguished; the first concerns strongly formative strains of biofilms, the secondary for medium formators and finally, those weakly biofilmogenic. Similarly, the results obtained showed that more than half (52%) of the strains used had hydrophobic potential, and more than 36% had relatively hydrophobic potential. For the self-aggregation test, more than half of the strains had potency greater than 50%.

According to statistical tests, a significantly positive correlation was recorded between the formation power of biofilms and the hydrophobicity of cell surfaces. In addition, epifluorescent microscopy revealed that the glass support was suitable for bacterial adhesion, more than the plastic one.

Keywords: Biofilm, Adhesion, Self aggregation, Hydrophobia, support.

Sommaire

Remerciements	I
Dédicaces	II
Résumé	IV
Liste des figures	VI1
Liste des tableaux	VIII
Liste des Abréviations	IX
Synthèse bibliographique	01
Matériel et méthodes	
1. Evaluation de la formation des biofilms	09
1.1 Méthode quantitative au cristal violet	09
2. Evaluation de l'hydrophobicité des souches	11
2.1 Méthode MATS	11
3. Test d'auto-agrégation	12
4. Effet de la nature du support sur l'adhésion bactérienne	13
Résultats et Discussions	
1. Evaluation de formation de biofilm	17
2. Evaluation de l'hydrophobicité des souches	21
3. Test d'auto-agrégation	25
4. Effet de la nature du support sur l'adhésion bactérienne	33
Conclusion	38
Références bibliographiques	40
Annexes	

N°	Titre	Page
Figure 1	Biofilms d' <i>Escherichia coli</i> O157:H7 souche 43895OR développés sur des coupons de verre.	1
Figure 2	Etapes de formation des biofilms microbienne.	3
Figure 3	Phases de formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> .	5
Figure 4	Auto agrégation microbienne et son rôle dans la formation des biofilms.	6
Figure 5	Protocole de l'évaluation de la formation des biofilms selon la technique d'O'Toole et al 2000.	10
Figure 6	Test d'adhésion bactérienne sur différent supports A et B.	14
Figure 7	Coloration des biofilm formés à la surface des puits. La barre représentel'erreur standard des moyennes.	17
Figure 8	Taux des souches ayant différents niveaux de formation des biofilms	18
Figure 9	Potentiels de formation des biofilms chez les souches étudiées.	19
Figure 10	Résultats du test de l'hydrophobicité des souches bactériennes. Séparation desphases organique et aqueuse.	21
Figure 11	Taux des souches ayant différents caractères d'hydrophobicité.	22
Figure 12	Evaluations d' hydrophobicité des souches étudiées selon la méthode MATS.	23
Figure 13	Résultats du test d'auto-agrégation des souches bactériennes.	25
Figure 14	Evaluations d'auto-agrégation des souches bactériennes.	26
Figure 15	courbes de l'évolution de l'auto agrégation au cours du temps.	30
Figure 16	Schéma du test de corrélation entre les variables : formation de biofilms, auto- agrégation et hydrophobicité. (Niveau de signification statistique : *** P<0.001, NS :P>0.05 (non significatif).	32
Figure 17	Observation microscopique de l'adhésion microbienne sur le support verreet plastique (Grossissement x40) (A) culture de la souche 15, (B) Contrôle négatif	35
Figure 18	Observation microscopique de l'adhésion microbienne sur le support plastique(Grossissement x40) (A) culture de la souche, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25912 (B) Contrôle négatif.	36

N°	Titre	Page
Tableau 1	Classification bactérienne selon leur potentiels de formation des biofilms (Mathur et al., 2006).	11
Tableau 2	le pourcentage de l'adhésion bactérienne au solvant (Mattos-Guaraldiet al. 1999).	12
Tableau 3	Tableau 3 : Tableau de séparation des souches en classe selon leurs taux d'auto agrégations.	33

AHL	N-acylhomoserine lactone
PBS	Phosphate Buffered Saline
MATS	Microbial Adhésion to Solvents
CV	cristal violet

Synthèse Bibliographique

La majeure partie de la biomasse sur terre est constituée de microorganismes, alors que plus de 90% de ceux-ci vivent en communauté, associés à une surface formant le biofilm (**Figure 1**), c'est un mode de vie métaboliquement actif conférant un abri aux cellules constitutives (**Singh et al., 2006**).

Le biofilm est une communauté microbienne adhérente à une surface et incluse dans une matrice de polymères extracellulaires (**Characklis, 1990**).

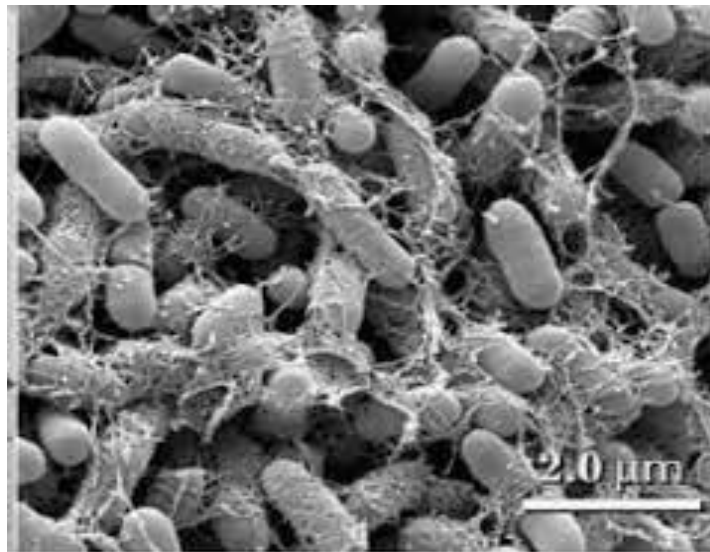


Figure 1 : Biofilms de *Escherichia coli* O157:H7 souche 43895OR développés sur des coupons de verre (**Baudin, 2017**).

Lors du XVII^e siècle et, grâce à l'invention du microscope, Antoine Van Leeuwenhoek a pu observer et mettre en évidence la présence de micro-organismes à partir de prélèvements de la surface de ses dents, cette carie dentaire n'était qu'un biofilm microbienne (**Roux et Ghigo, 2006**).

En 1933, Arthur Henrici a observé des dépôts de micro-organismes qui s'épaississent progressivement sur des lames en verre prolongées dans son aquarium.

Par la suite, en 1940 Heukelekian et Heller ont développé la notion « effet de bouteille », résultant de la constatation que la présence d'un substrat solide comme une bouteille en verre, permettait aux micro-organismes de se fixer dessus. Trois ans plus tard, en 1943 Claude Zobell et al. ont observé que la quantité de bactéries fixées sur un substrat solide était supérieure à celle des bactéries libres dans le milieu liquide.

Cependant, ce n'est que dans les années 1970, sous l'impulsion de Characklis puis de Costerton, que l'étude des biofilms a réellement pris son essor. En effet, Characklis en 1973 a

démontré que la matrice exopolymérique confère à ces structures communautaires une résistance aux désinfectants ; tandis que Costerton *et al.*, (1978), ont proposé le terme biofilm. Selon ces auteurs, les biofilms sont des communautés microbiennes, adhérentes à un support biotique ou abiotique et engluées dans une matrice extracellulaire de bio polymère autoproduites. Ces structures peuvent être formées par la même espèce ou d'espèces différentes.

En revanche, la communication intercellulaire est assurée par des signaux chimiques ; ce système, appelé « Quorum Sensing », est un système moléculaire de communication des bactéries sessiles (**Heilmann *et al.*, 2015**). Il permet l'adaptation des microorganismes à la modification de l'environnement et ce, par la régulation de leur l'expression génétique (**Bricha *et al.*, 2009**).

Le Quorum Sensing chez les bactéries à Gram positif utilise un système d'auto induction de nature peptidique. Chez les bactéries Gram négatif, c'est le N-acyl homoserine lactone (AHL) qui est utilisé (**Irie et Parsek, 2008**).

L'activité métabolique des microorganismes est basculée entre deux mode de vie radicalement différents. Il s'agit de l'état planctonique, où les microorganismes sont libres dans leur environnement. Cependant, le mode de vie majoritaire est celui dans lequel les microorganismes sont attachés fortement à une surface et forment une communauté microbienne (**Seddiki, 2021**).

Pour la matrice extracellulaire des biofilms (**Figure 2**), elle représente environ 50 à 90% de celui-ci, or que les microorganismes n'occupent que 2 à 15% du volume totale de la structure (**Costerton *et al.*, 1999 ; Sutherland, 2001 ; Donlan, 2002**). En fait, la matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau (**Tremblay *et al.*, 2014**) . Elles confèrent au biofilm sa densité et sa force cohésive interne et donc, sa résistance aux phénomènes de détachement. La composition de la matrice est très variable, elle dépend des micro-organismes constitutifs, des signaux environnementaux qui gèrent le métabolisme cellulaire (**Liu et Tay, 2002 ; Stoodley *et al.*, 2002**), et les conditions de croissance (**Bury, 2007**). Toutefois, la matrice extracellulaire est constituée principalement de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de lipides, de glycolipides et de cations (**Tremblay *et al.*, 2014**), elle peut être constituée également de matériaux non cellulaires tels que les cristaux minéraux (**Donlan, 2002**).

Quoi que la composition matricielle et cellulaire diffère d'un biofilm à l'autre, les étapes de sa formation ne le sont pas. Globalement, les bactéries initie la formation d'un biofilm

en réponse à un stress environnemental, tel que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un inhibiteur de la croissance microbienne (**Annous *et al.*, 2009 ; Vu *et al.*, 2009**).

Les différentes études ont montré que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent. La formation se fait généralement en quatre phases selon une séquence bien établie ; initialement les microorganismes adhèrent à un support et forment ensuite le biofilm (**figure 2**), ceci comprend l'adhésion à un support, la croissance et l'agrégation en micro colonies, la maturation et le maintien de l'architecture du biofilm avec l'élaboration des molécules du quorum sensing (**Haras, 2005 ; Seddiki, 2021**).

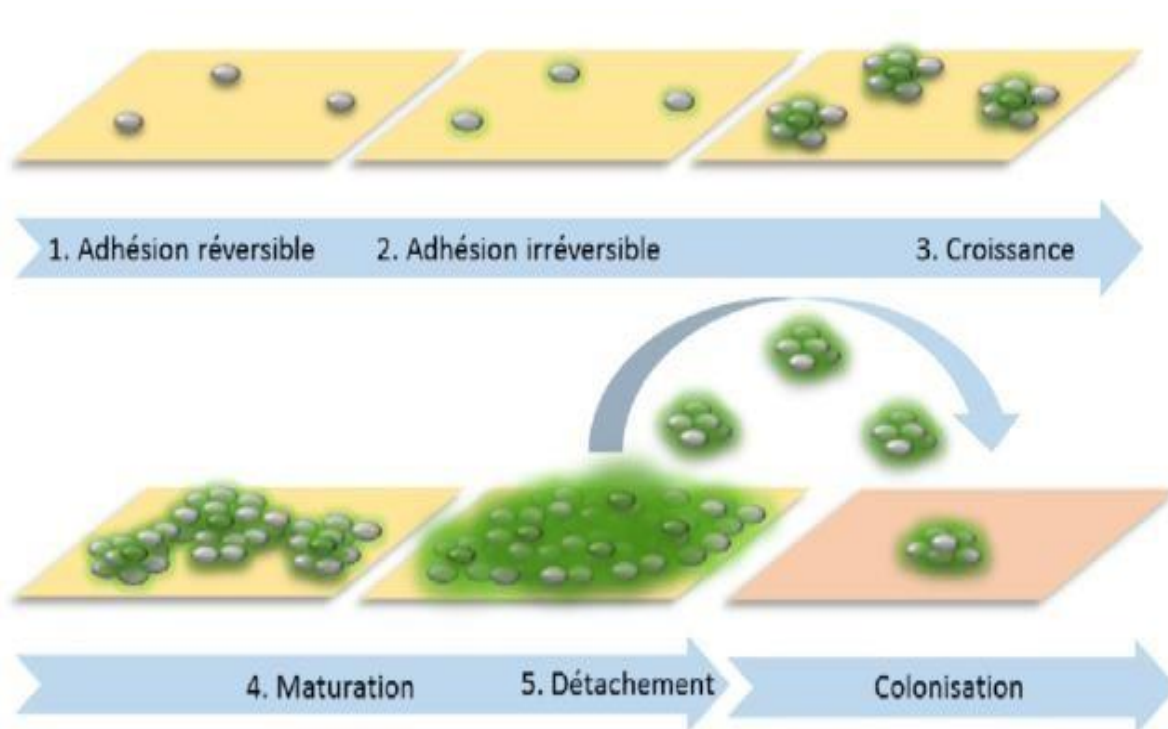


Figure 2 : Etapes de formation des biofilms microbienne (**monroe, 2007**).

La formation des biofilms est précédée parfois par le revêtement primaire de la surface à coloniser, ce film est considéré comme un siège d'absorption de grosses molécules, telles que l'acide humique, les sucres et les protéines. L'adsorption de ces molécules conduit à des modifications des propriétés physico-chimiques de la surface du support, par conséquent la création d'un microenvironnement favorable à l'adhésion des bactéries (**Gottenbos *et al.*, 1999 ; Bakker *et al.*, 2004 ; Lorites *et al.*, 2011**).

La formation des biofilms débute suite à l'adhésion des microorganismes au support. Cet attachement constitue la phase clé de ce phénomène puis qu'il est la pierre angulaire de tout biofilm microbienne **(Seddiki, 2021)**.

La phase d'adhésion est, elle-même, divisée en deux. La première non spécifique et réversible, fait intervenir un processus physicochimique ; impliquant certaines interactions non spécifiques **(Hori et Matsumoto, 2010)**.

En fait, dans ce premier temps, l'adhésion est due aux interactions bactérie / support, c'est une adhésion fragile modulée par des forces d'attractions et de répulsions entre la surface des microorganismes et celle du support, les microorganismes peuvent facilement se détacher, l'adhésion est donc réversible **(Branger et al., 2007; Pecastaings, 2010; Muller et Guaguere 2014)**.

La seconde est spécifique, elle implique un phénomène biologique d'adhésion irréversible entre le microorganisme et la surface du support. Dans ce deuxième temps, l'adhésion devient active et spécifique et ce selon les types des microorganismes la nature du support et les conditions environnementales **(Hori et Matsumoto, 2010)**.

Pour les bactéries à Gram négatif, l'adhésion irréversible dépendent largement des curli, des pili et des capsules. Cependant, chez les bactéries Gram positif, se sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix qui régissent ce phénomène **(Davey et al., 2000)**.

Des interactions fortes s'établissent donc entre les bactéries et la surface, ce qui rend l'adhésion irréversible, permettant ainsi de consolider la fixation au support **[(Spiers et al., 2003) ; (Kuchma et al., 2005)]**.

Une fois fixées de manière irréversible, les microorganismes entame leur croissance et forment des colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface **[(Stanley et al., 2003) ; (Klausen et al., 2006)]**. Le biofilm subit ensuite une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à la formation d'une structure hétérogène tridimensionnelle **[(Costerton et al., 1995) ; (Davey et O'Toole, 2000) ; (Sauer et al., 2002)]**. Dans celle-ci se forment des canaux permettant la circulation de nutriments, d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien.

Finalement, l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance (**Costerton *et al.*, 1999**). Toutefois, la structure du biofilm dépend des conditions environnementales telle que la source de carbone [(**Stanley *et al.*, 2003**) ; (**Klausen *et al.*, 2006**)].

La dispersion du biofilm (**figure 3**) conduit à libérer des agrégats cellulaires et/ou des cellules planctoniques ; ceux-ci peuvent alors coloniser de nouveaux environnements, créant de nouveaux biofilms lointains (**Costa-Orlandi *et al.*, 2017, Sheppard et Howell, 2016, Visick *et al.*, 2016**).

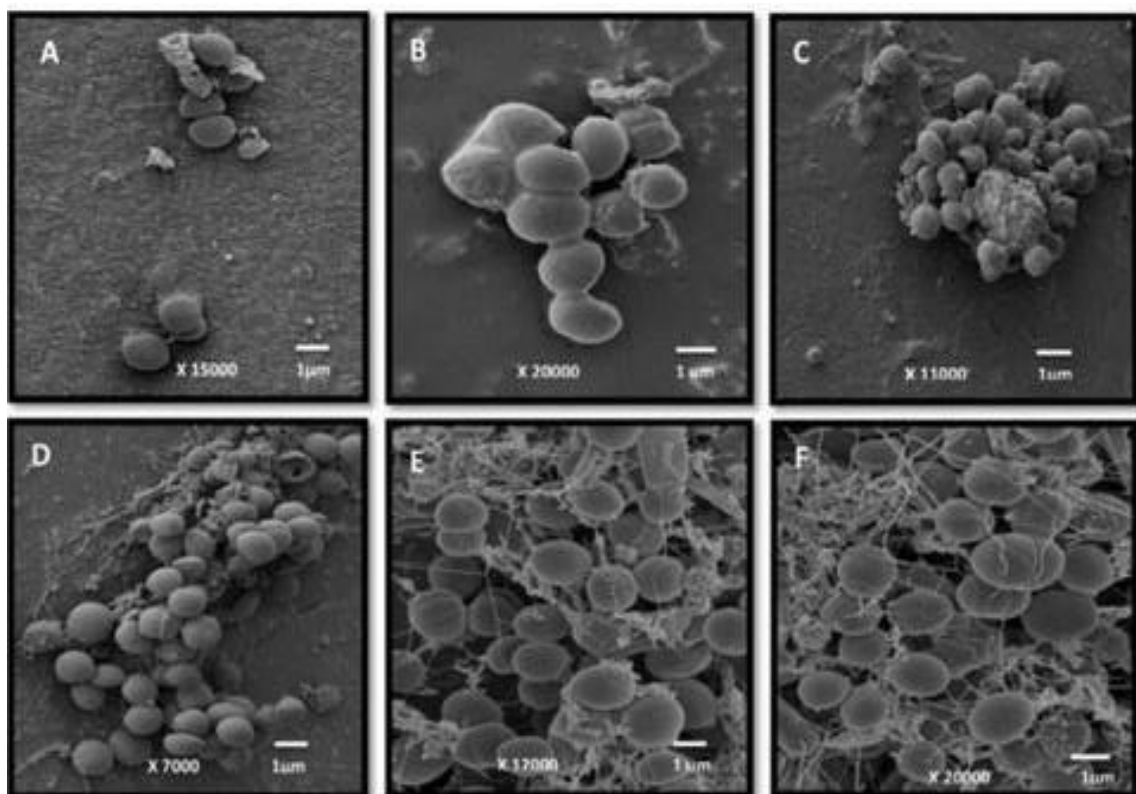


Figure 3: Phases de formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* (**Rebiahi *et al.*, 2014**)

A : Adhésion cellulaire sur une surface .**B :** Regroupement des cellules en structure tridimensionnelle. **C :** Synthèse visible de la matière polysaccharidique. **D :** Réticulation entre les différentes cellules par la matière polysaccharidique. **E et F :** Maturation du biofilm.

Par ailleurs, toutes ces phases peuvent être précédées par un phénomène d'agrégation cellulaire, en effet, certaines bactéries planctoniques présentent la capacité de se lier entre elle pour former des amas multicellulaires (Seddiki, 2021).

Il s'agit de l'auto-agrégation chez les bactéries appartenant à la même espèce et la co-agrégation chez les espèces différentes ces phénomènes conduisent à la formation de micro colonies, ce qui augmente les chances de former les biofilm (Figure 4) (O'Toole, Kolter, 1998).

Les cellules agrégées ont un avantage concurrentiel sur les cellules individuelles, car à des densités cellulaires plus élevées, les cellules placées au sommet de l'amas ont un meilleur accès aux nutriments (Kragh *et al.*, 2016).

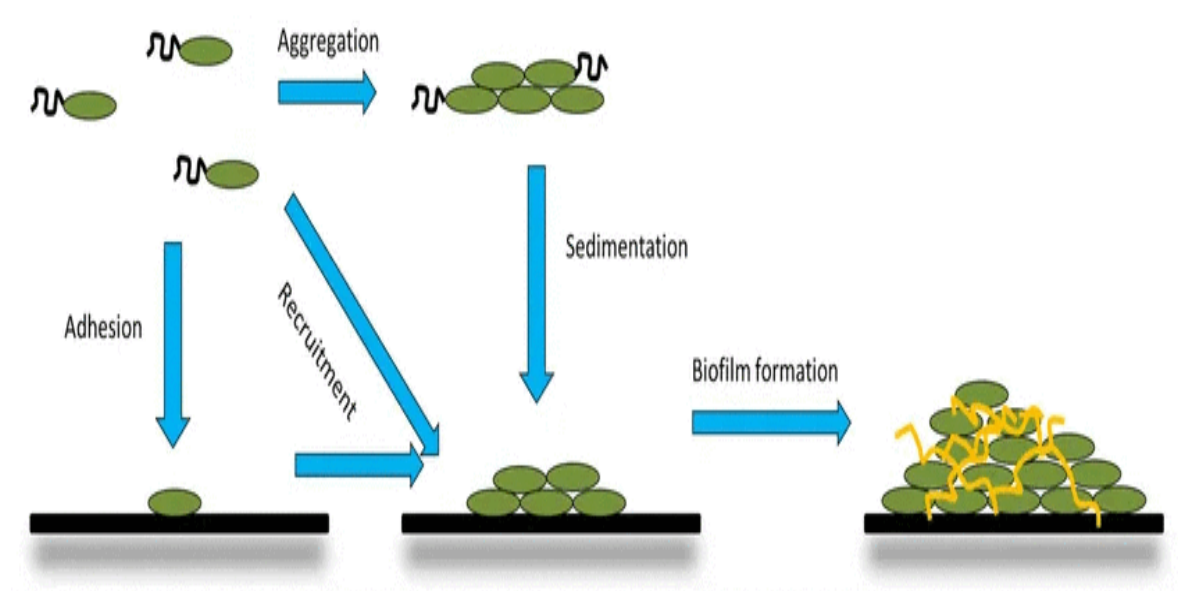


Figure 4 : Auto-agrégation microbienne et son rôle dans la formation des biofilms (Trunk *et al.*, 2018)

D'autres facteurs influent l'adhésion bactérienne à une surface, elle est plus importante lorsque celle-ci est rugueuse (Characklis, 1990 ; Donlan et Costerton, 2002). De plus, les supports hydrophiles, comme le verre qui présente une forte affinité à l'eau et les solvants polaires, réduisent l'adhésion microbienne. À contraire, elle est consolidée par l'effet hydrophobe, tel que celui du téflon et du plastique (Bendinger *et al.*, 2003).

Outre ces-ci, certaines bactéries forment les biofilm dans des conditions variables, alors que d'autres bactéries nécessitent des conditions particulières de température, de pH ou encore de nutrition (Clutterbuck *et al* 2007).

Les biofilms ont une importance sanitaire car ils sont largement associés aux problèmes de santé publique, ils sont souvent impliqués dans l'infection chez l'homme, dont 60 % des infections nosocomiales (**Costerton *et al.* 1995**) ;(**Roux et Ghigo., 2006**).

Les germes pathogènes impliqués peuvent être transmis d'un endroit à l'autre ou tout objet ou instrument peut servir de moyen de transport ou de vecteur de microorganismes (**Conly *et al.*, 1989**).

À la lumière de toutes les données précédentes, l'étude des biofilms bactériens et de l'adhésion cellulaire nécessitent une attention particulière.

Dans cette optique, notre étude s'intéresse à l'étude de l'adhésion microbienne et la formation des biofilms sur deux supports différents, verre et plastique, constituant le revêtement extérieur des téléphones mobiles. L'adhésion bactérienne sur ces instruments, largement utilisés dans le milieu hospitalier par le personnel soignant, pouvant jouer le rôle de vecteur des microorganismes pathogènes, peut constituer une source de contamination, d'où l'infection.

Compte tenu de toutes ces données, nous nous sommes fixés les objectifs suivants afin de mettre l'accent sur l'aptitude des microorganismes, déjà isolés à partir des téléphones portables, à adhérer sur les surfaces, similaires à celles des téléphones portables. Ceci nécessite l'évaluation de :

- la formation des biofilms par les souches isolées.
- Phénomène d'auto-agrégation cellulaire.
- l'hydrophobicité des surfaces microbiennes.
- l'adhésion cellulaire sur les supports en verre et en plastique.
- Observation microscopique des biofilms.

Matériel et Méthodes

Cette étude est réalisée dans le laboratoire de microbiologie, département de biologie, CU NAAMA. Elle vient compléter celle de M^{elle} GHANDOUR O, Mémoire de master en Microbiologie Appliquée soutenue en (2020). Isolé à partir téléphone portable du personnel soignant.

Une deuxième partie de cette étude est effectuée dans le laboratoire de recherche « Laboratory for sustainable Management of Natiral resources Arid and Semi-arid Zones Naâma.

1) Evaluation de la Formation des Biofilms

La méthode décrite en 1985 par **Christensen et al.**, permet de quantifier la biomasse des biofilms microbienne. Le principe se base sur la coloration au cristal violet qui est chargé positivement, celui-ci se lie aux molécules extracellulaires de charges négatives, tels que les polysaccharides de la matrice exo polymérique des biofilms. La méthode modifiée du **O'Toole et al, (2000)** est utilisé.

A partir d'une culture microbienne de 18 heures, une centrifugation est réalisée pendant 5 minutes à 3000 g. Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot est lavé deux fois par de l'eau physiologie stérile. Après, une deuxième centrifugation, le surnageant est éliminé, puis deux ml de bouillon nutritif sont ajoutés (**Annexe2**). La densité optique de la suspension est ajustée entre (0.08 à 0.1 UFC) à 570 nm grâce à colorimètre (**WPA-Colourwave-CO7500 Colorimètre**).

300 µl de la suspension bactérienne sont mises dans les puits d'une microplaque stérile à 96 puits, après incubation pendant 42 heures à 37°C, le milieu liquide est éliminé et les puits sont rincés deux fois avec de l'eau de robinet pour écarter les cellules planctoniques et/ ou les cellules non adhérentes. 300 µl d'une solution au cristal violet à 0.5% (p/v) (**Annexe2**) sont ajoutés au puits et laissés ensuite pendant 45 min à la température ambiante du laboratoire. Après avoir éliminé le colorant, la microplaque est rincée deux fois à l'aide de l'eau de robinier. Les biofilms formés sont ensuite décolorés suite à l'addition de 300 µl d'éthanol (95%) pendant 10 minutes (**Annexe2**). Cette opération permet l'élimination du cristal violet non incorporé dans le biofilm. La microplaque est rincée deux fois à l'aide d'eau de robinier, puis 300 µl d'acide acétique (33%) (**Annexe2**), sont ajoutés dans les puits et sont laissés pendant 20 minutes (**Figure 5**). Le contenu de chaque puits est transféré dans une nouvelle microplaque stérile à raison de 250 µl. Celle-ci est ensuite introduite dans un lecteur de plaque (**Microplate Reader 2100-c**) pour mesurer l'absorbance à 630 nm.

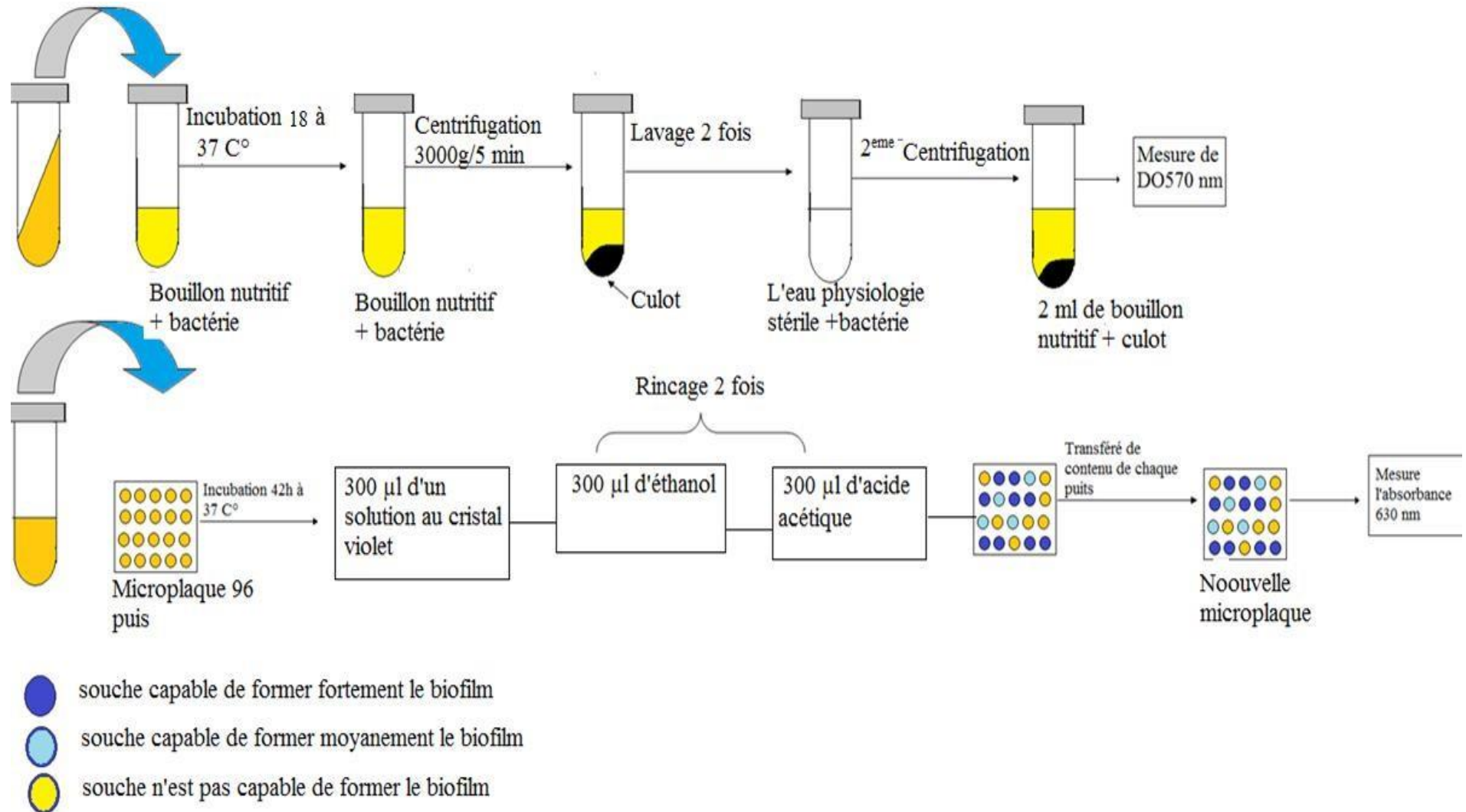


Figure 5 : protocole de l'évaluation de la formation des biofilms selon la technique O'Toole *et al* 2000.

Deux souches de référence sont utilisées pour le contrôle positif, un test de contrôle négatif est également réalisé. Trois répétitions sont effectuées pour chaque souche.

Les biofilms sont classés en trois catégories en fonction de leur valeur d'absorbance, et selon la classification de **Mathur et al., (2006)**.

Tableau 1 : Classification bactérienne selon leurs potentiels de formation des biofilms
(**Mathur et al., 2006**).

Valeur d'absorbance	Formation de biofilm
$A < 0.028$	Absente
$0.028 \leq A \leq 0.056$	Modérée
$0.056 < A$	Forte

2) Evaluation de l'hydrophobicité des souches

La capacité de formation des biofilm est proportionnellement influencée par le caractère hydrophobe de la surface des microorganismes. La technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) permet l'évaluation de l'hydrophobicité (**Krepsky et al., 2003**).

À partir d'une culture jeune (18h) ensemencé sur gélose nutritif, les colonies sont suspendues dans 4 ml du tampon PBS (pH 7,2) (**Annexe 2**). Elles sont ensuite incubées dans un bain marie à 37°C pendant 10 minutes. 400 µL d'hexane sont ajoutés à la suspension bactérienne. Le mélange est ensuite agité au vortex pendant une minute. Puis est laissé à la température ambiante pendant 15 minutes pour avoir une séparation complète entre deux phases, organique et aqueuse.

L'absorbance de la phase aqueuse est mesurée à 570 nm (**WPA-Biowave II+**). Le pourcentage d'adhésion au solvant est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Adhésion} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

A0 : absorbance du contrôle.

A1 : absorbance de l'échantillon.

L'hydrophobicité des souches est évaluée selon leur pourcentage d'adhésion (**Tableau 2**).

Tableau 2 : le pourcentage de l'adhésion bactérienne au solvant (**Mattos-Guaraldi et al., 1999**).

Pourcentage d'adhésion	Propriété de surface
> 50	Hydrophobie
20-50	Relativement hydrophobie
< 20	Non Hydrophobie

3) Test d'auto-agrégation

L'agrégation des microorganismes sur une surface est un phénomène qui précède l'étape de formation de biofilms. Les bactéries s'agrègent suite aux interactions hydrophobes de leurs surfaces et d'agglutinine de surface de charge opposée (**Seddiki, 2021**).

L'auto-agrégation est effectuée selon la méthode décrite par **Del Re et al., (2000)**. À partir d'une culture jeune (18 heures à 37°C) ensemencé sur gélose nutritif, des colonies sont mises dans 3 ml de tampon PBS, réalisée dans des tubes coniques, la suspension est centrifugée à 4000g pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé deux fois avec du tampon PBS, on ajoute quelque ml de tampon PBS (**Annexe2**).

La suspension cellulaire est ensuite agitée au vortex pendant 10 secondes puis laissée incuber à la température ambiante du laboratoire.

L'absorbance est mesurée immédiatement, puis après toutes les 30 minutes pendant les deux premières heures et enfin, après 24 heures. L'absorbance est mesurée à 600 nm. Grâce à un spectrophotomètre (**WPA-Biowave II+**).

Le pourcentage d'auto-agrégation est calculé selon l'équation suivante :

$$\left(A_0 - \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100.$$

A1 : Absorbance pendant le temps t = 30 minutes ; 1h ; 1h : 30 minutes ; 2h et après 24h. A0 : absorbance à t = 0 heure.

4) Effet de la nature du support sur l'adhésion bactérienne

La formation des biofilms passe impérativement par la phase d'adhésion, celle-ci est influencée par plusieurs paramètres, dont la nature du support sur lequel le biofilm se forme (Seddiki, 2021).

Puisque les souches utilisées ont été isolées à partir des surfaces des téléphones mobiles, deux types de supports sont utilisés afin d'évaluer leur impact sur l'adhésion bactérienne ; le premier en verre, le second en plastique. La nature du support affecte, en effet, son hydrophobicité/hydrophilie.

Les pièces de rechange du verre des téléphones mobiles ainsi que des surfaces en plastique transparent et mince sont utilisées comme supports, ladite surface verre n'est que la pièce anti casse de protection de l'afficheur de téléphone portable. Ceux-ci sont bien rincés à l'aide de l'eau de javel puis à l'eau distillée stérile. Ils sont mis ensuite dans des sacs stériles puis exposés aux rayons UV (**VILBER LOURMAT 77202 MARNE LA VALLEE 6CODEX 1**

France). Un traitement de conditionnement est effectué en plongeant les supports dans du plasma bovin, cette opération permet de renforcer l'adhésion des bactéries (**Peters T, 1985**).

Les supports sont placés séparément dans des boîtes de Petri contenant de l'eau distillée stérile. Ces supports sont mis dans l'étuve pour incubation pendant 24 heures à 37°C.

Dans cette partie de l'étude, deux souches de références et dix souches de la collection sauvage y compris les souches isolées des téléphones portables sont choisies selon leurs différents pouvoirs à former les biofilms, fort, moyen ou faible.

Pour cela, l'inoculum est préparé à partir d'une culture bactérienne jeune de 18 heures. Celui-ci est réalisé suite à une centrifugation (3000g, 5 minutes) suivie de deux lavages successifs du culot à l'aide de l'eau physiologique stérile. Une deuxième centrifugation permet de récupérer les cellules bactérienne (culot) aux quelles deux ml de bouillon nutritif sont ajoutés.

300 µl de la suspension bactérienne sont déposés sur les supports, déposés eux-mêmes sur un autre support stérile pour éviter leur émergence dans l'eau distillée introduites dans les boîtes de Petri (**Figure 6**). L'incubation est réalisée à 37°C pendant 42 heures.

Un test de contrôle négatif est également effectué ; il consiste à inoculer les supports par un milieu de culture stérile.

Tous les tests sont réalisés en double.

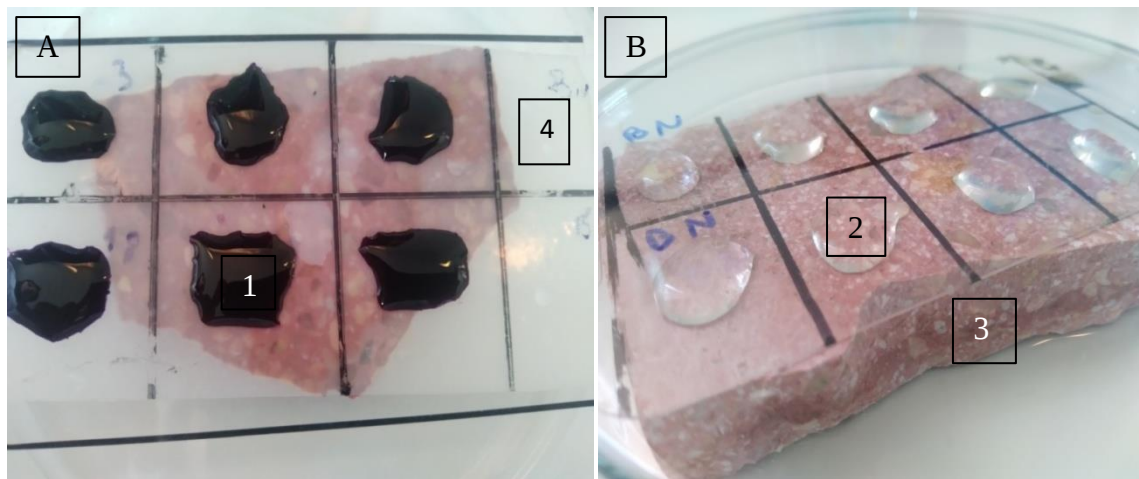


Figure 6 : Test d'adhésion bactérienne sur différents supports A et B.

- 1 : cristal violet.
- 2 : Inoculum.
- 3 : Isolant.
- 4 : Surface du support.

Le milieu liquide est éliminé et les supports sont rincés deux fois avec de l'eau de robinet. 300 µl d'une solution au cristal violet à 0.5%(P/V) (**Annexe 2**) sont déposés sur les endroits des inoculations puis laissés pendant 45 minutes à la température ambiante. Après avoir éliminé le colorant, les supports sont rincés deux fois. Les biofilms formés sont ensuite décolorés par l'addition de 300 µl d'éthanol (95%) (**Annexe2**) pendant 10 minutes et ce afin de permettre l'élimination du cristal violet non incorporé dans le biofilm. Les supports sont encore rincés une fois à l'aide d'eau de robinier.

L'observation microscopique est effectuée à l'aide d'un microscope optique (**OPTIKA MICROSCOPES DC5V500 mA**). Cette technique consiste à grossir l'image d'un objet de petites dimensions en le plaçant, entre l'objectif et le détecteur optique du microscope.

Un microscope epifluorescente est utilisé (**EuromaxiScope, 110-240v /50-60 HZ**).Le principe repose sur l'effet fluorescent, généré par les électrons en émettant une énergie suite à leur excitation par des lumières de différentes longueurs d'ondes.

Un laser d'une longueur d'onde donnée excite les fluorochromes de l'échantillon qui, en réponse, émettent une fluorescence. Lorsque des photons arrivent au contact d'une molécule fluorescente, celle-ci subit par conséquence un changement de son niveau d'énergie. Par la suite, la molécule se désexcite en émettant un photon. De ce fait, la fluorescence est émise à une longueur d'onde plus grande et une énergie plus basse que la lumière absorbée. Dans le cas des molécules organiques, la fluorescente se distingue par des zones de couleurs intenses (**Nadia boutaleb, 2007**).

Analyse statistique

Pour discuter les résultats de cette étude, des tests statistiques ont été réalisés pour analyser les données. Une analyse de corrélation a été effectuée entre les trois paramètres étudiés (formation de biofilm, l'auto-agrégation, hydrophobie) grâce au logiciel PAST, version 4.03.

Une séparation des souches en classe selon leurs taux d'auto agrégations a été réalisée via le paramètre des quartiles ($\leq 25\%$, $25 < \leq 75\%$, $> 75\%$).

Résultats et Discussion

1) Evaluation de la formation des biofilms

Pour l'évaluation de la formation des biofilms, la méthode modifiée de **O'Toole *et al.*, (2000)** est utilisée, elle repose sur la coloration des biofilms par le cristal violet.

La formation des biofilms par la collection des souches utilisées est révélée en premier lieu à l'œil nu (**Annexe 4**) (**Figure 7**).

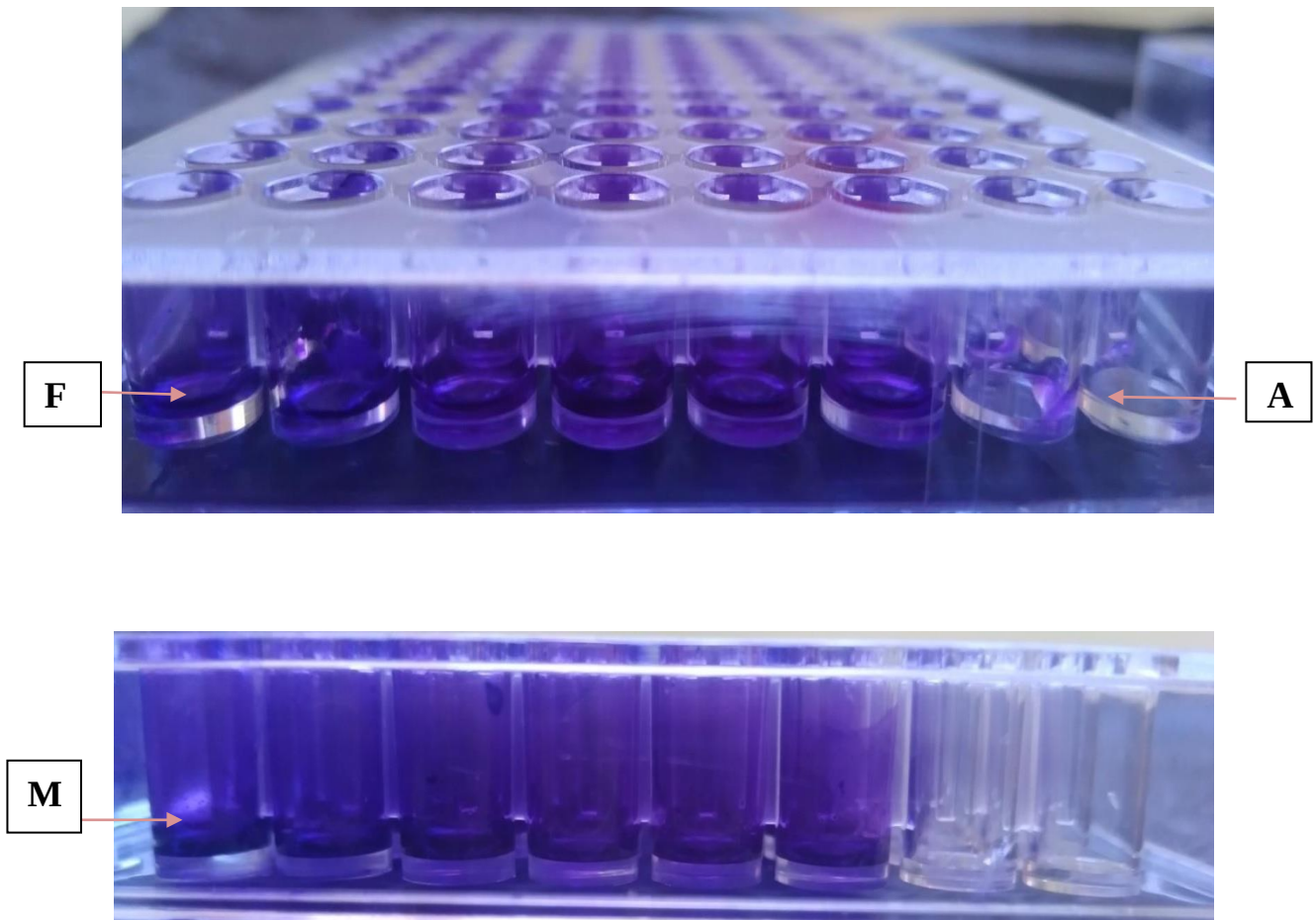


Figure 7 : Coloration des biofilm formés à la surface des puits.

Les flèches indiquent :

-**F** : potentiel fort.

-**M** : potentiel moyen.

-**A** : potentiel absent.

Selon cette figure, une différence en termes d'intensité de la couleur violette est observée entre les différents puits des microplaques. Cette différence traduit les différents niveaux du potentiel à former les biofilms.

Par ailleurs, la méthode spectrophotométrique a révélé trois niveaux du potentiel de formation des biofilms, il s'agit d'un potentiel fort, moyen ou absent (**Figure 8**).

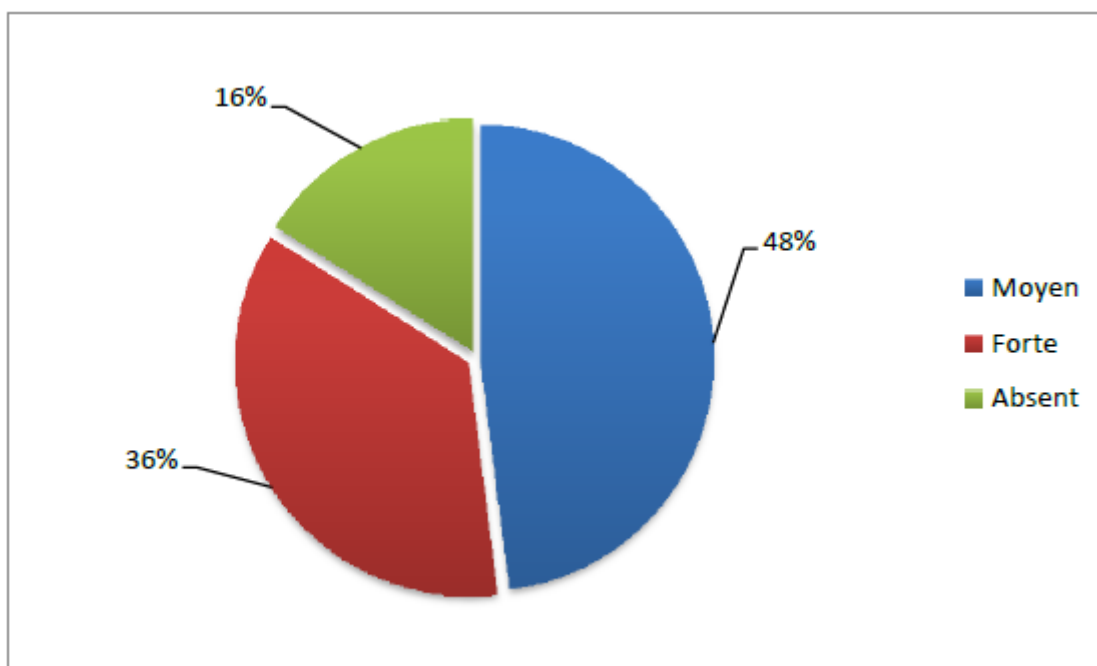


Figure 8 : Taux des souches ayant différents niveaux de formation des biofilms.

Il ressort des résultats obtenus que presque la moitié des souches (48%) ont présenté un potentiel moyen quant à la formation des biofilms. Celles-ci sont suivies par celles qui ont enregistré un fort potentiel (36%). Globalement, 84 % des souches sont pourvu de ce potentiel. Cependant, seulement quatre (4) souche n'ont présente aucune aptitude à former les biofilms. Les résultats détaillés sont regroupés dans (**Annexe3**).

Selon **Costerton et al., 1999** plus de 90%des microorganismes forment les biofilms.

Selon l'étude de Ghandour (2020), *Pseudomonas Spp.* est la bactérie la plus isolée à partir des téléphones portables utilisés par le personnel soignant de l'hôpital de Naâma. Cette bactérie s'est présentée capable de former les biofilms, 11/12 bactéries sont, en effet, positives vis-à- vis de ce potentiel. Une seule, *P. fluorescens* (13), s'est révélé dépourvu de la capacité de formation des biofilms (**Figure9**).

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste, causant des infectons pulmonaires mortelle (**Mavrodi et al., 2001**). Cette espèce, est en effet, capable de former des biofilms dans la plupart des conditions qui permettent sa croissance (**Rasamiravaka et al., 2014**).

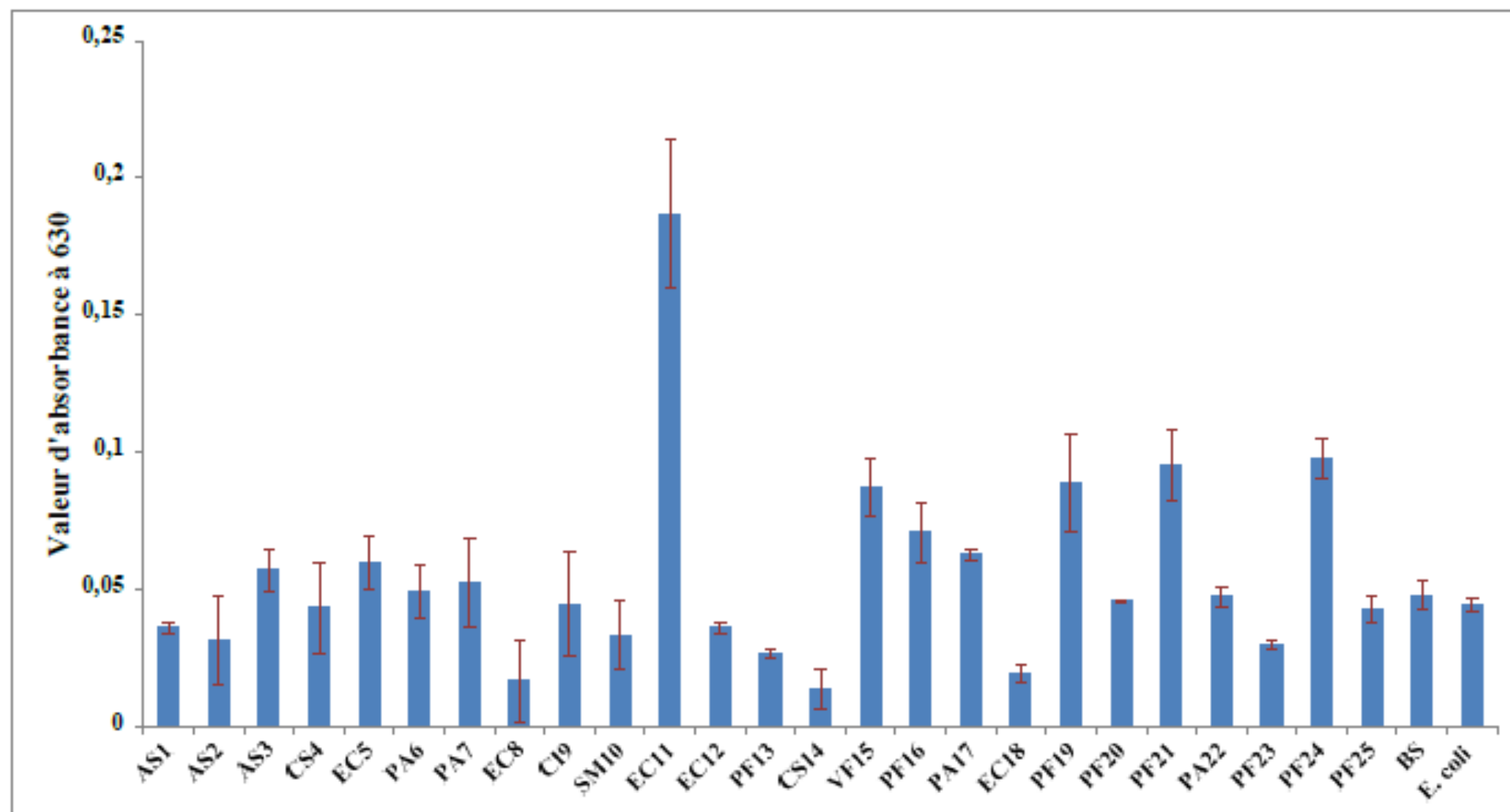


Figure 9 : Potentiels de formation des biofilms chez les souches étudiées. La barre représente l'erreur standard des moyennes.

De plus, chez les entérobactéries, le potentiel de formation des biofilms varie d'une espèce à l'autre ; en fait la formation des biofilms est variable au sein d'une même espèce (**figure9**). *Enterobacter cloacae* (EC11) s'est révélé l'espèce la plus fortement formatrice des biofilms.

Enterobacter cloacae présente une production de biofilm très élevée **Nargis et al., (2017)** Cette espèce est fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales (**Qureshi et al., 2011**), elle est le plus souvent représentative du genre *Enterobacter* (**Fraser et al., 2010**).

Par ailleurs, chez *Cronobacter Spp* (CS14) aucun pouvoir à former les biofilms n'est enregistré. D'autre part, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium indologenes* et *Vibrio fluvialis*, qui ne sont représentées que par un seul individu, ont également présenté une capacité de former les biofilms.

Selon **O'Toole et al., (2000)** et **Yildiz et al., (2009)** ont étudié la formation de biofilm par les espèces de *Vibrio*. De plus, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Chryseobacterium indologenes* sont deux espèces qui ont la capacité de former les biofilms. **DiBonaventura et al., (2004)**, **Pompilio et al., (2011)**, **Yuichi et al., (2013)** et **Yi-Chang et al., (2015)**.

En ce qui concerne les deux souches de références, *Escherichia coli* ATCC 25912 et *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ont enregistré un niveau moyen potentiel de formation des biofilms.

La formation des biofilm diffère d'une espèce à l'autre selon leur environnement. En effet, la capacité d'un microorganisme à former un biofilm varie si les conditions de croissance changent (**Seddiki, 2021**).

2) Evaluation de l'hydrophobicité des souches bactériennes

La technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) consiste à évaluer le degré d'affinité des microorganismes isolés vis-à-vis d'un solvant, l'hexane. Deux phases sont distinguées dans les tubes après l'interaction des bactéries avec l'hexane, organique et aqueuse (**Figure10**).

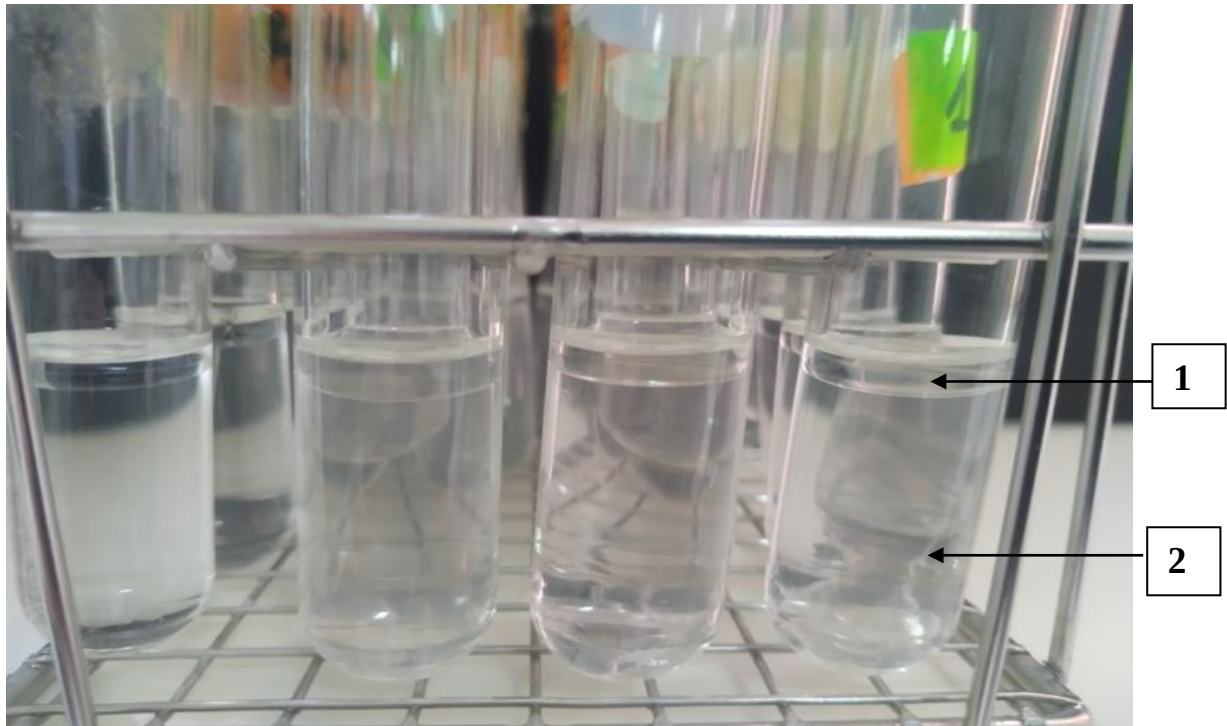


Figure 10 : Résultats du test de l'hydrophobicité des souches bactériennes. Les flèches indiquent les phases organiques (1) et aqueuses (2).

Globalement, le caractère d'hydrophobicité s'est révélé chez 88%des souches (**Figure11**). Les résultats de cette étude ont enregistré 13/25 souches au caractère hydrophobe soit un taux de (52%). Ces souches ont présenté une valeur d'adhésion supérieure à 50%. Cependant, neuf souches (36%) sont relativement hydrophobes, avec des taux d'adhésion compris entre 20% et 50%. En revanche, trois (12%) souches (EC8, PF13, CS14) ont une surface très hydrophile avec une valeur d'adhésion inférieure à 20%.

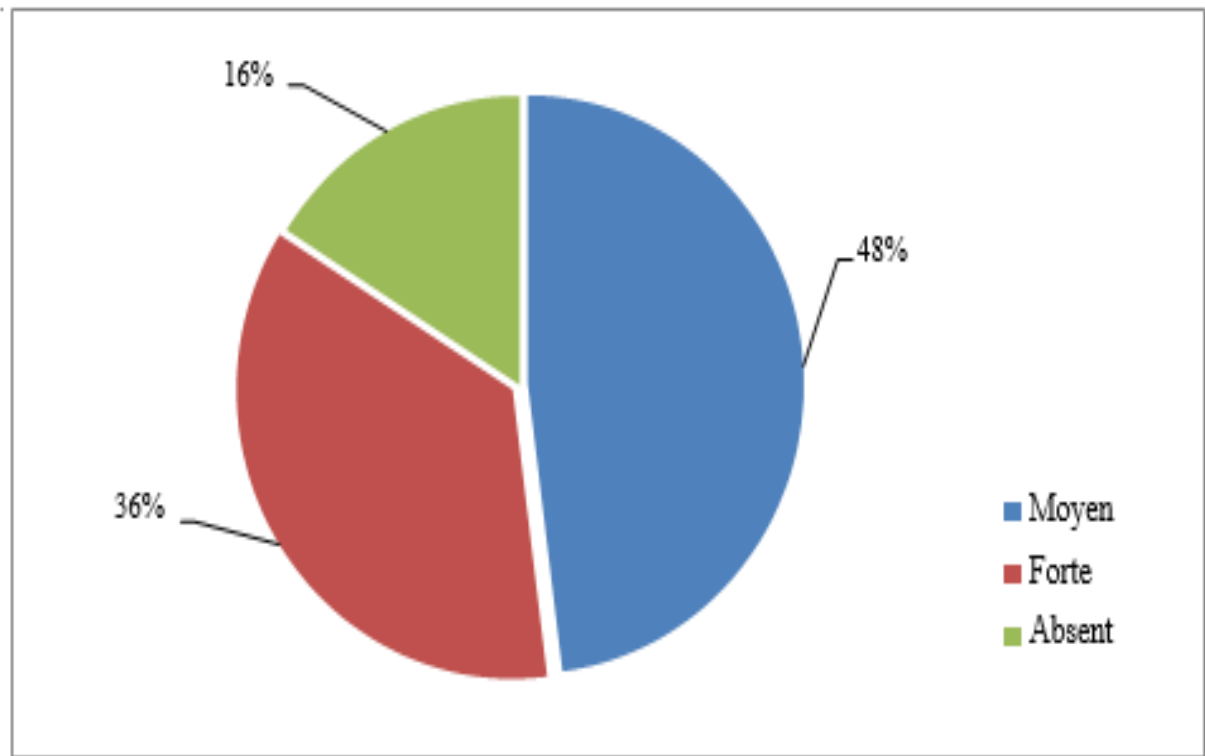


Figure 11 : Taux des souches ayant différents caractères d'hydrophobicité.

Cette étude, a montré que 11/12 souche de *pseudomonas Spp.* et 4/5 souche de *Enterobacter cloacae* se dotent d'un potentielle d'hydrophobicité, variable entre hydrophobe et relativement hydrophobe (**Figure12**). Cependant, seulement une seule souche de chaque espèce (PF13 et EC8) présent un caractère non hydrophobe (**Annexe5**).

Selon **Pasmore et al., (2001)** l'augmentation de l'hydrophobicité de *P. aeruginosa* entraîne une augmentation de l'adhésion et l'initiation de la formation de biofilm. Cette bactérie adhère

mieux qu'une souche hydrophile **Bruinsma et al., (2001)**.

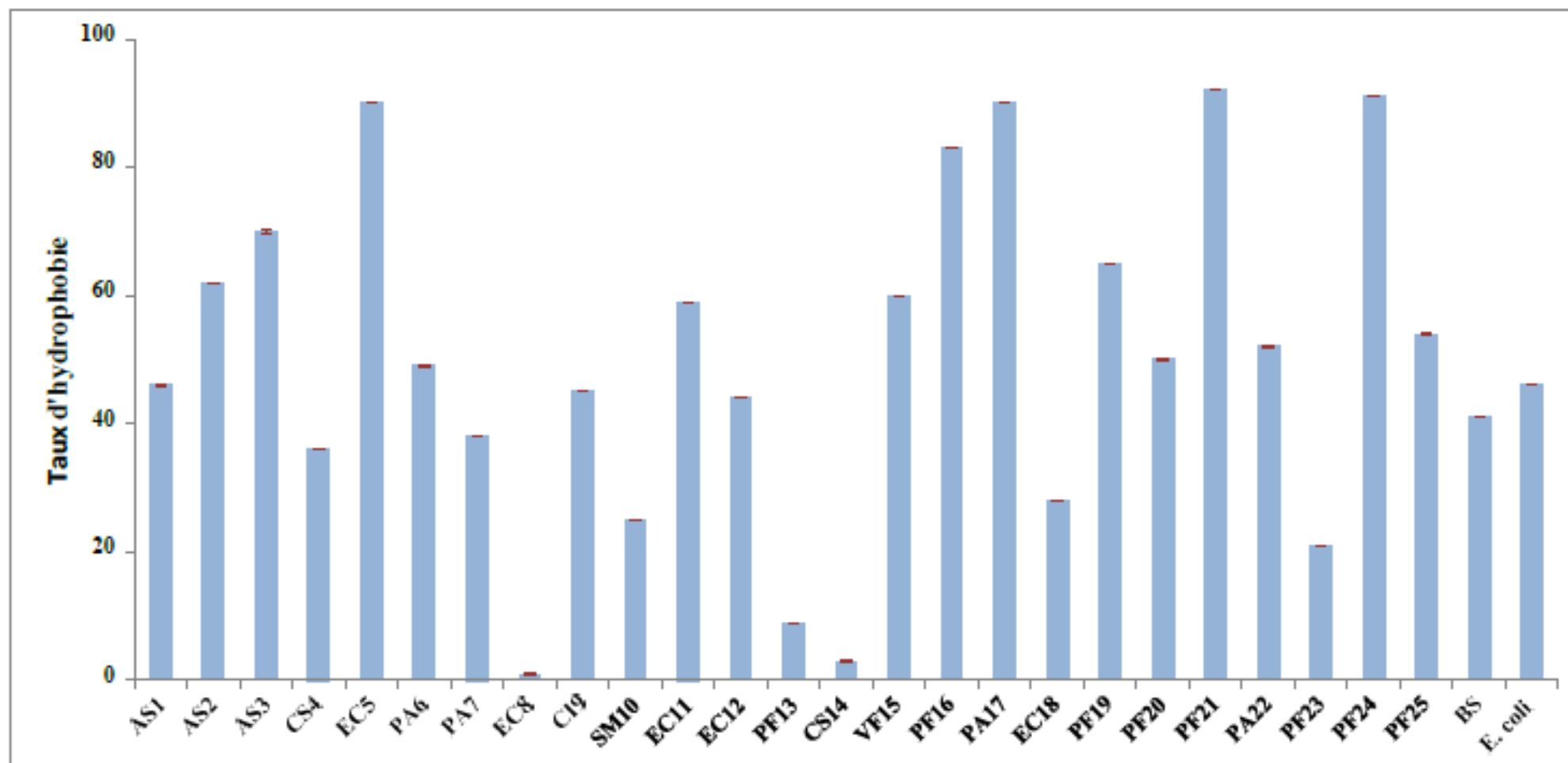


Figure 12 : Evaluations d'hydrophobicité des souches étudiées selon la méthode MATS. La barre représente l'erreur standard des moyennes.

D'autre part *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium indologenes* et *Vibrio fluvialis*, qui sont représentées que par un seul individu, ont également présenté un potentiel d'hydrophobie. En revanche, *Cronobacter Spp.* (CS14) ne représente aucun potentielle d'hydrophobicité (**Figure 12**).

Selon **Jana et al., (2000)** et **Cappello et al., (2006;)**, hydrophobicité se le paramètre clé du processus d'adhésion bactérienne aux supports.

Nombreux auteurs ont observé que l'adhésion des bactéries hydrophiles est plus importante sur les supports hydrophiles, cependant les bactéries hydrophobes adhèrent plus sur les supports hydrophobes. Ceci dit que, l'adhésion des bactéries hydrophobes est généralement supérieure à celle des bactéries hydrophiles (**Bellon et al., 1990 ; Bruinsima et al., 2001 ; Gallardo-Moreno et al., 2002 ; Bayoudh et al., 2006**).

Il est à montrer que les bactéries Gram positif ont une partie lipidique représenté par l'acide lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule, confère à celle-ci une surface hydrophobe. Cependant, la plupart des bactéries Gram négatif ont de longues chaines de polysaccharides exposées à l'extérieur, ayant pour résultat une surface hydrophile (**Frank, 2001**).

Toutefois, la plupart des bactéries sont chargées négativement mais contiennent toujours des composants de surface hydrophobes (**Donlan, 2002**).

Par ailleurs, le potentiel de l'hydrophobicité est enregistré avec un niveau relativement hydrophobe. Chez les deux souches de références, *Escherichia coli* ATCC 25912 et *Bacillus subtilis* ATCC 21332.

3) Test d'auto-agrégation

La formation des biofilms est souvent le résultat de l'agrégation des microorganismes à la surface sur lequel se forment les communautés microbiennes. La technique de **Del Re et al(2000)** utilisée dans cette étude, a révélé des taux d'auto-agrégation variable entre les souches.

La figure 13 illustre les zones dont l'auto agrégation est visible dans les tubes après 24 heures d'incubation.

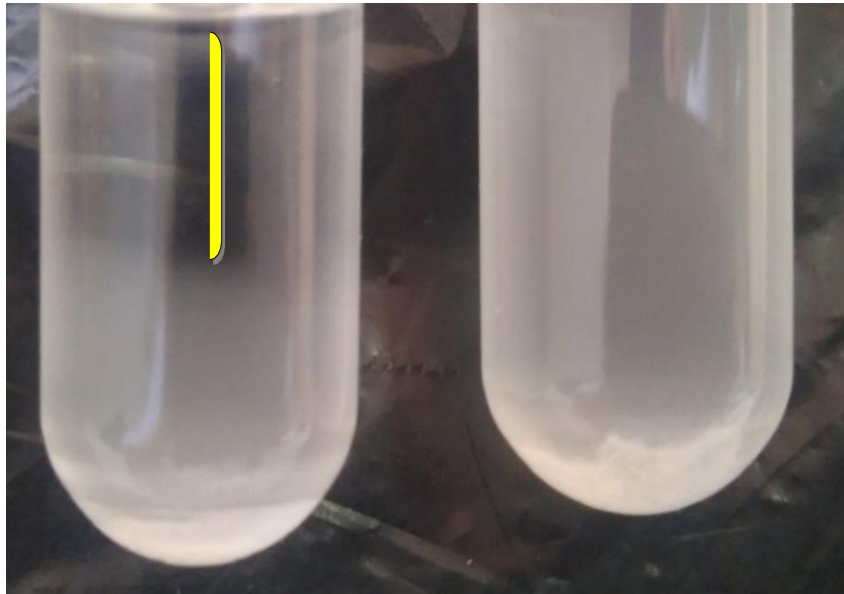


Figure 13 : Résultats du test d'auto-agrégation des souches bactériennes.
La zone claire témoigne de l'auto agrégation (barre jaune).

Il ressort des résultats obtenus un potentiel d'auto-agrégation supérieur à 39% chez *Pseudomonas Spp.* Et *Enterobacter cloacae* (**Figure 14**).

La majorité des souches appartenant à *Pseudomonas Spp.* (92%) ont présenté ce potentiel d'auto-agrégation. Les souches du genre *Enterobacter cloacae* (80%) ont le révélé le même taux d'auto-agrégation (**Annexe 7**).

D'autre part *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium indologenes* et *Vibrio fluvialis*, qui ne sont représentées que par un seul individu, chaque 'un taux d'auto agrégation supérieur à 60%. *Cronobacter Spp.* Et *Aeromonas salmonicida Spp.* Quant à elles, ont présenté un potentiel

d'auto-agrégation supérieur à 50%. En revanche, seulement *Cronobacter Spp.* (CS14) et *Aeromonas salmonicida Spp.* (AS1), ont présenté un potentiel d'auto-agrégation faible.

Par ailleurs, les deux souches de références, *Escherichia coli* ATCC 25912 et *Bacillus subtilis* ATCC 21332, ont présenté le potentiel de a enregistré un niveau d'auto agrégation supérieur à 60%.

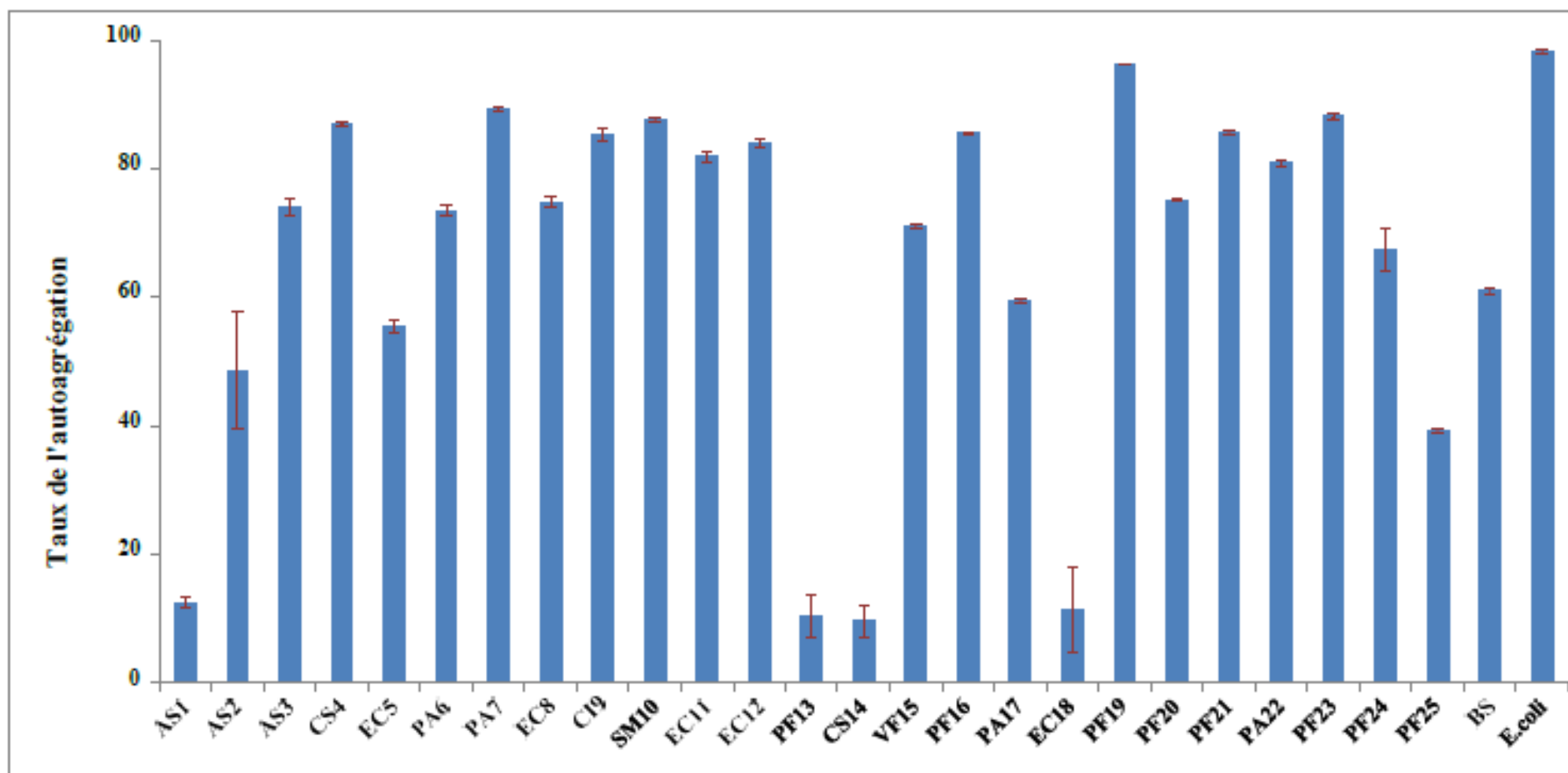
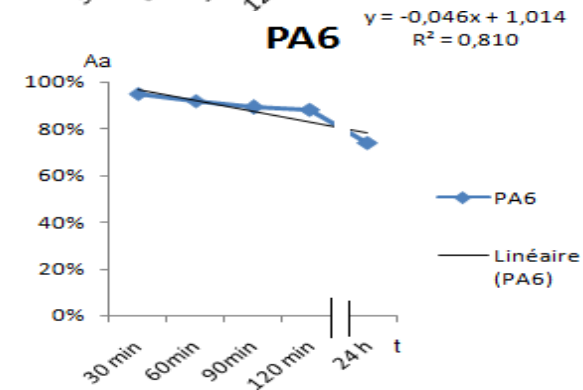
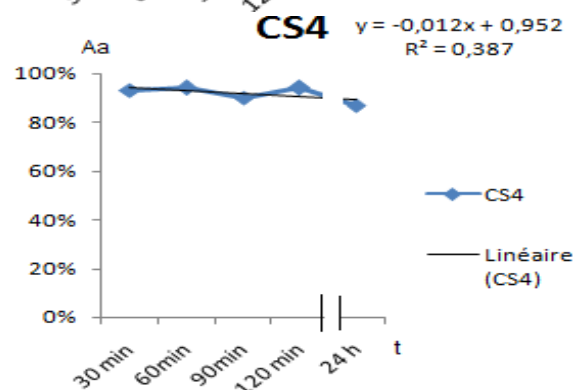
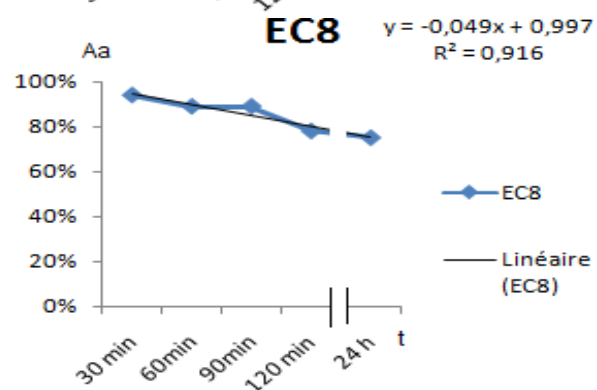
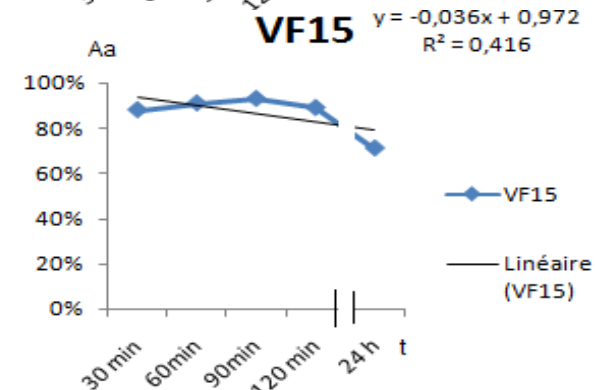
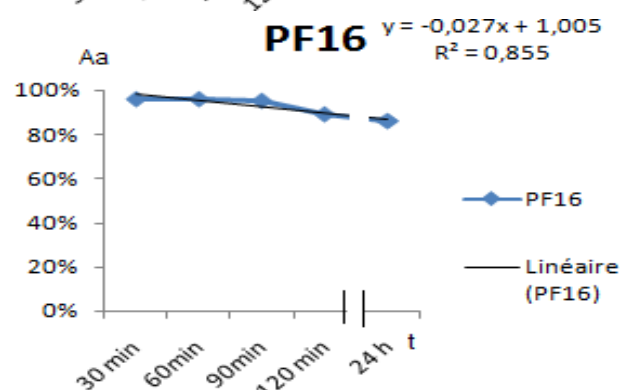
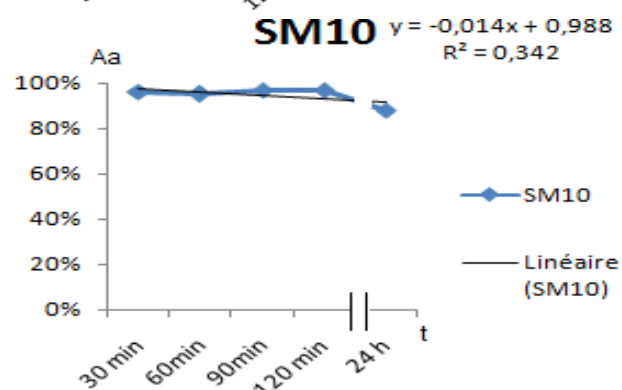
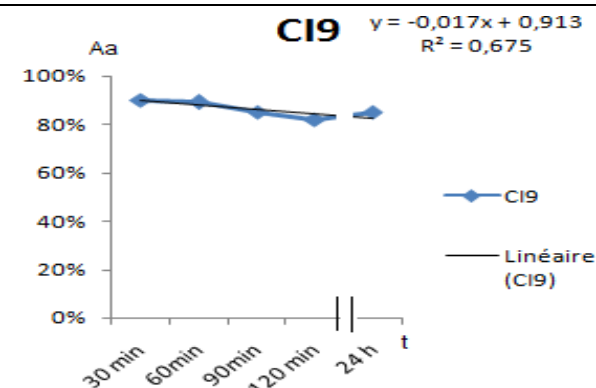
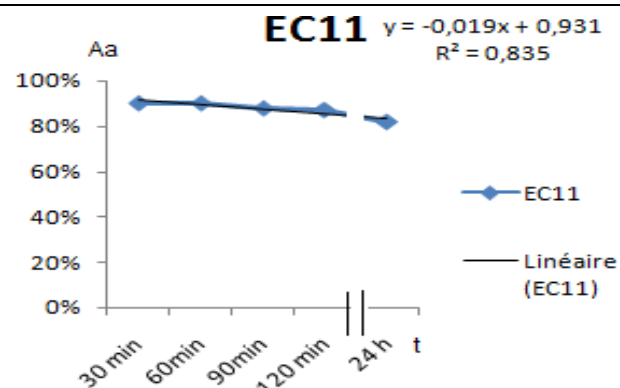
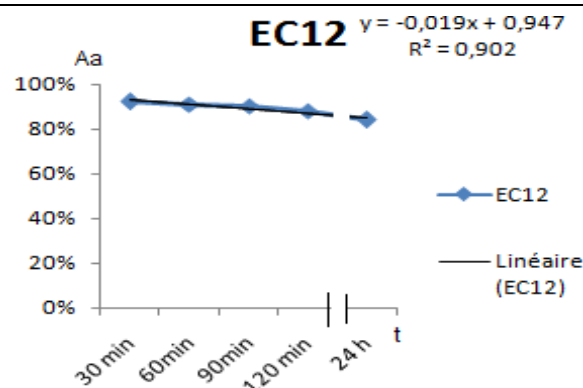


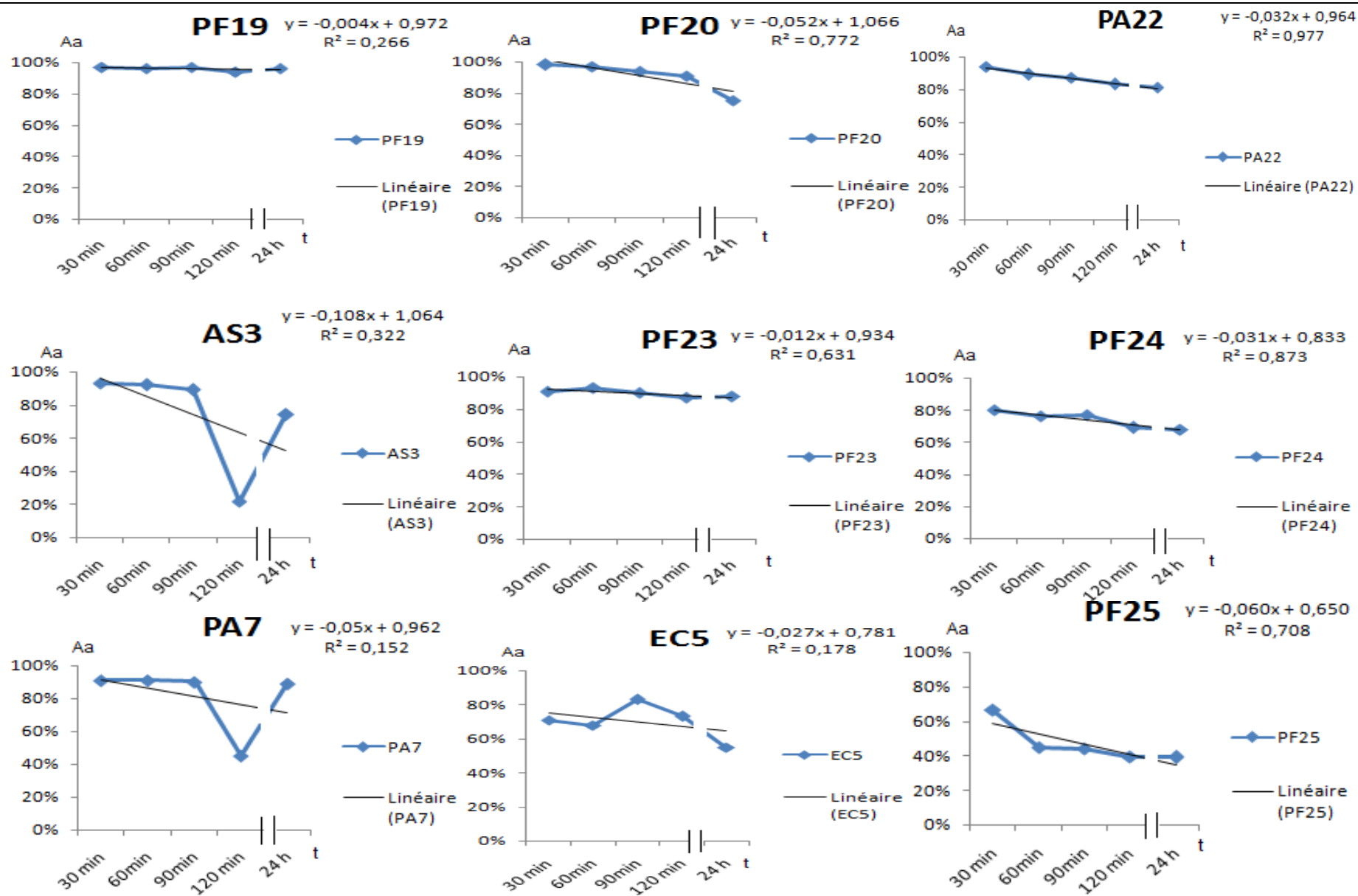
Figure 14 : Résultats du test d'auto-agrégation des souches bactériennes. La barre représente l'erreur standard des moyennes

L'auto-agrégation est l'un des facteurs clés qui détermine la capacité d'adhésion des souches (**Ouwehand et Vesterlund, 2004 ; Abdulla *et al.*, 2014**). Il s'agit d'un phénomène largement observé chez les espèces environnementales et pathogènes (**Trunk *et al.*, 2018**). Au fait, Suite à l'interface hydrophobe et d'agglutinines de surface, microbiennes de charge opposée, les bactéries s'agrègent (**Del Re *et al.*, 2000**).

L'auto-agrégation est considérée comme étant un caractère nécessaire à l'adhésion (**Ren *et al.*, 2014**).

les micro-agrégats microbiens évoluent vers des macro-agrégats (**Six *et al.*, 2004**). Ce macro-agrégats se désagrègent et forment à nouveau plusieurs micro-agrégats plus stables (**Oades, 1984; Oades, 1993**). Suite à l'établissement de liaison polysaccharidique (**Bronick *et al.*, 2005**).





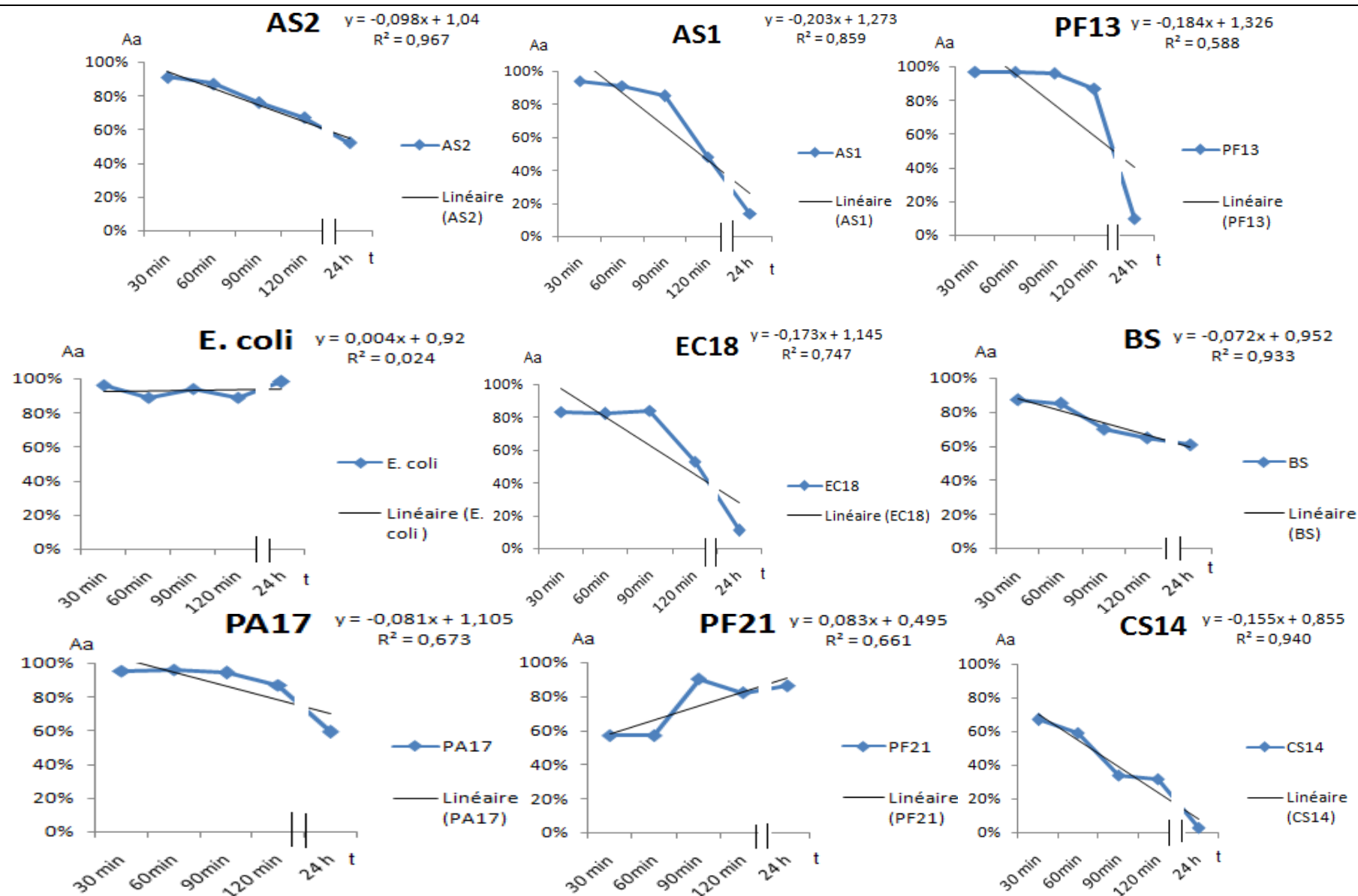


Figure 15 : courbes de l'évolution de l'auto agrégation au cours du temps.

Le test de l'auto-agrégation a été évalué au cours du temps et ce, afin d'avoir une idée sur son évolution. Vis-à-vis de chaque souche bactérienne.

Les résultats sont représentés dans la **(figure 15)**. Il s'avère que le taux de l'auto agrégation diminue avec le temps ; cette diminution varie une souche à l'autre **(Annex6)**.

Environ 15/25 souches ont présenté un taux d'auto-agrégation qui diminue légèrement avec le temps. Il est important de souligner que ce taux reste élevé chez ces individus même après 24 heures d'incubation **(Figure 15)**. Cependant, un deuxième groupe des souches (AS1 ; AS2 ; PF13 ; CS14 ; PA17 ; EC18) ont présenté un taux qui diminue progressivement mais légèrement durant l'incubation des 120 minutes.

Premières quatre-vingt-dix minutes d'incubation. Par la suite, une chute des graphes représentatifs **(Figure 15)** est observée après 120 minutes d'incubation. Ceci témoigne de la diminution des taux d'auto agrégation chez ces souches après 120 minutes d'incubation.

En revanche, trois (AS3 ; PA7 ; EC5) ont présenté un taux d'auto-agrégation qui change au cours du temps entre 90 et 120 minutes d'incubation. Celui-ci a brusquement diminué, puis a augmenté progressivement.

Généralement, toutes les souches ont un taux d'auto agrégation diminué avec le temps, cette diminution se traduit mathématiquement par l'équation $y = -a x + b$ avec un coefficient de détermination (R^2) variable d'une souche à l'autre. Plus la valeur de ce dernier est proche à 1, plus le résultat est fiable. Exceptionnellement, la seule souche (PF 21) dont le taux a augmenté durant le temps d'incubation obéit à la formule mathématique $y = 0,083x + 0.495$ avec $R^2 = 0,661$.

Selon les résultats de l'étude statistique **(Figure 16)**, il y a une corrélation directe entre la formation des biofilms et l'hydrophobicité des surfaces bactériennes ; le coefficient de corrélation $r = 0,58$. Cette corrélation s'est montrée hautement significative ($*** P < 0.001$).

En effet, d'autres auteurs ont montré le constat de corrélation d'hydrophobie de surface et la formation de biofilm sur le verre et sur le plastique **(Di Bonaventura et al., 2007)**; **(McQueary et Actis, 2011)**.

Par contre, aucune corrélation entre la formation de biofilm et l'auto-agrégation n'est révélée ; le coefficient de corrélation est réduit ($r = 0,37$). Ce résultat est également observé pour la relation entre l'hydrophobicité et l'auto-agrégation avec un coefficient de corrélation $r = 0,30$.

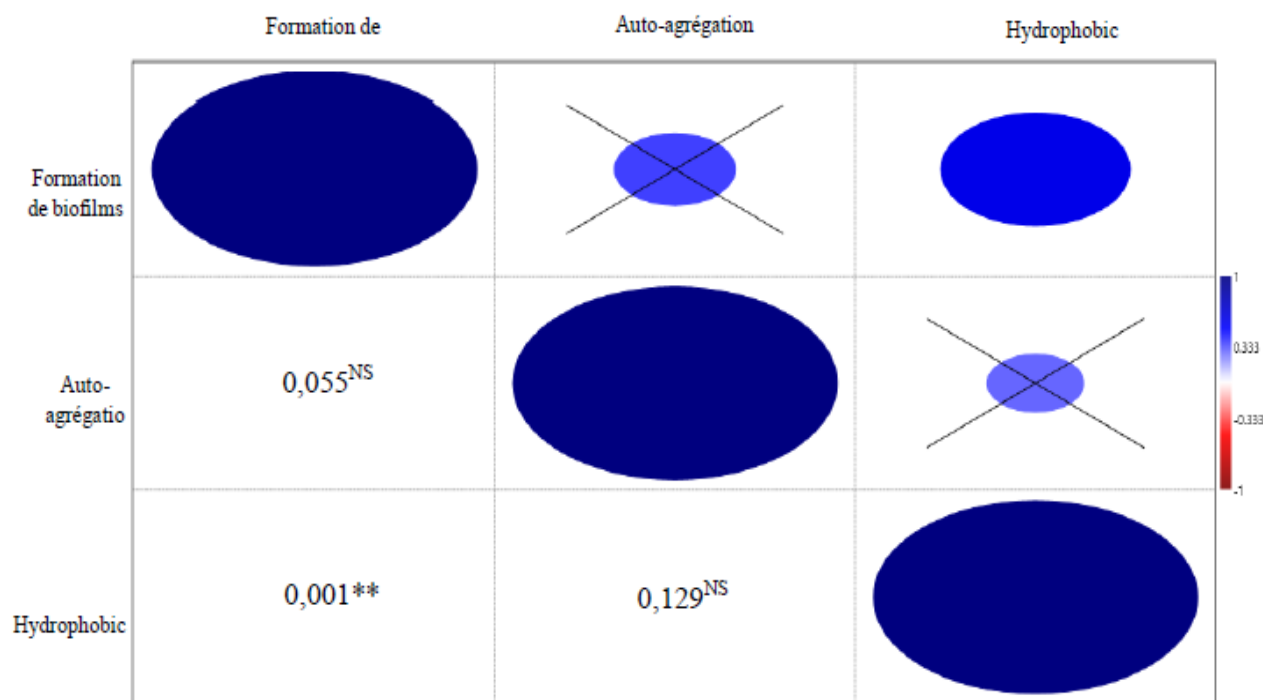


Figure 16 : Schéma du test de corrélation entre les variables : formation de biofilms, auto-agrégation et hydrophobicité. (Niveau de signification statistique : *** $P < 0.001$, NS : $P > 0.05$ (non significatif)).

En se référant aux résultats de cette étude, plus la souche est hydrophobe, plus la biomasse du biofilm formé est importante. Tenant compte du test de l'hydrophobicité et celui du potentiel de la formation des biofilms, les souches dont l'hydrophobicité était supérieure à 50% ont adhéré aux microplaques et ont donné une importante biomasse. Par conséquent, ces résultats montrent que la capacité d'adhésion et la biomasse du biofilm formé sont liées à l'hydrophobicité des surfaces (**Figure 16**). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Donlan, (2002)**, **Busscher et al., (2010)** et de **Bujdaková et al., (2013)** qui ont observé une corrélation directe entre ces phénomènes.

La séparation des souches en classe selon leurs taux d'auto agrégations a été réalisée via le paramètre des quartiles ($\leq 25\%$, $25 < \leq 75\%$, $> 75\%$). Les résultats ont révélé trois (3) catégories distinctes.

En effet, une première classe, qualifiée de faible taux d'agrégation a présenté un taux inférieur ou égal 57%. La deuxième classe a affiché un taux supérieur à 57% et inférieur à 75%, celle-ci est qualifiée d'auto-agrégation moyenne. En outre, à un taux supérieur ou égal à 75%, l'auto-agrégation est dite forte.

De ce fait, les souches de cette étude peuvent être classées comme suite (**Tableau 3**).

Auto-agrégation fort	Auto-agrégation moyenne	Auto-agrégation faible
CS4 ; PA7 ; EC8 ; CI9 ; SM10 ; EC11 ; EC12 ; PF16 ; PF19 ; PF20 ; PF21 ; PA22 ; PF23 ; E. coli.	AS3 ; PA6 ; VF 15 ; PA 17 ;PF 24 ; BS.	AS1 ; AS2 ; EC5 ; PF13 ; CS14 ; EC18 ; PF2

Tableau 3 : Tableau de séparation des souches en classe selon leurs taux d'auto agrégations.

4) Effet de la nature du support sur l'adhésion bactérienne

Le test d'adhésion permet d'évaluer et de comparer ce pouvoir chez les bactéries étudiées vis-à-vis de différentes surfaces. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'adhésion des bactéries sur deux supports, le verre et le plastique.

Les résultats obtenus ont montré une différence quant à l'opacité de la couleur violette du cristal violet entre les deux supports (**Figure 17**). Cette différence témoigne de la rétention du colorant par les matrices des biofilms formés sur chacun des deux supports.

Toutes les souches soumises à ce test, (AS3 ; PA7 ; CI9 ; EC11 ; EC12 ; PF13 ; VF15 ; PF16 ; PA17 ; EC18), ont présenté une adhésion plus importante sur le support verre que celui en plastique.

Ces résultats peuvent être partiellement expliqués par le fait que la majorité des souches testées ont été isolées à partir des surfaces en verre, celles des téléphones portables du personnel soignant de l'hôpital de Naâma.

En revanche, une capacité d'adhésion similaire entre les souches de références, *Escherichia coli* ATCC 25912 et *Bacillus subtilis* ATCC 21332 a été observé sur les deux supports, en verre et en plastique.

L'adhésion bactérienne aux supports est fonction des propriétés physico-chimiques de celui-ci

; (**Kuhn et al., 2002**). Contrairement aux résultats obtenus dans cette étude, **Bendinger** avait avancé en 2003 que les supports hydrophiles, comme le verre, réduisent l'adhésion microbienne.

Selon Baillif et al., 2010, l'hydrophobicité du support joue un rôle important dans l'adhésion par rapport à l'hydrophobicité de la bactérie. Par contre, celle-ci est consolidée par l'effet

hydrophobe, tel que celui du plastique.

Selon les résultats cités plus haut, une corrélation significative est enregistrée entre le pouvoir de formation des biofilms et l'hydrophobicité de la surface microbienne. Effectivement, les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire influencent l'adhésion bactérienne aux supports **(Bellon-Fontaine et Cerf, 1991)**. En effet, plus l'hydrophobicité des cellules bactériennes augmente, plus l'adhésion devient importante **(Neu, 1996 ; Jana, 2000)**.

Dans cette étude, les supports utilisés ont été soumis à un prétraitement protéique par le sérum bovin. **Nobbs, (2009)** a documenté la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, celui-ci influence l'adhésion bactérienne à sa surface et favorise la formation de biofilms.

Selon l'observation microscopique, la plupart des souches étudiées ont présenté une capacité d'adhésion plus importante au support verre que celle observée sur le support plastique **(Annexe8)**. D'après Kukavica-Ibrulj en 2007, les souches de même espèce bactérienne, n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces.

Sur une surface donnée, en raison des différentes caractéristiques physicochimiques, l'adhésion bactérienne est fonction de l'espèce, voire de la souche bactérienne **(Baillif et al., 2010)**.

En effet, l'augmentation ou la diminution de l'adhésion bactérienne est due à leurs caractéristiques de surfaces différentes **(Baillif et al., 2010)**.

D'autre part, la température de croissance peut avoir un effet significatif sur l'adhésion **(Dumas, 2007)**.

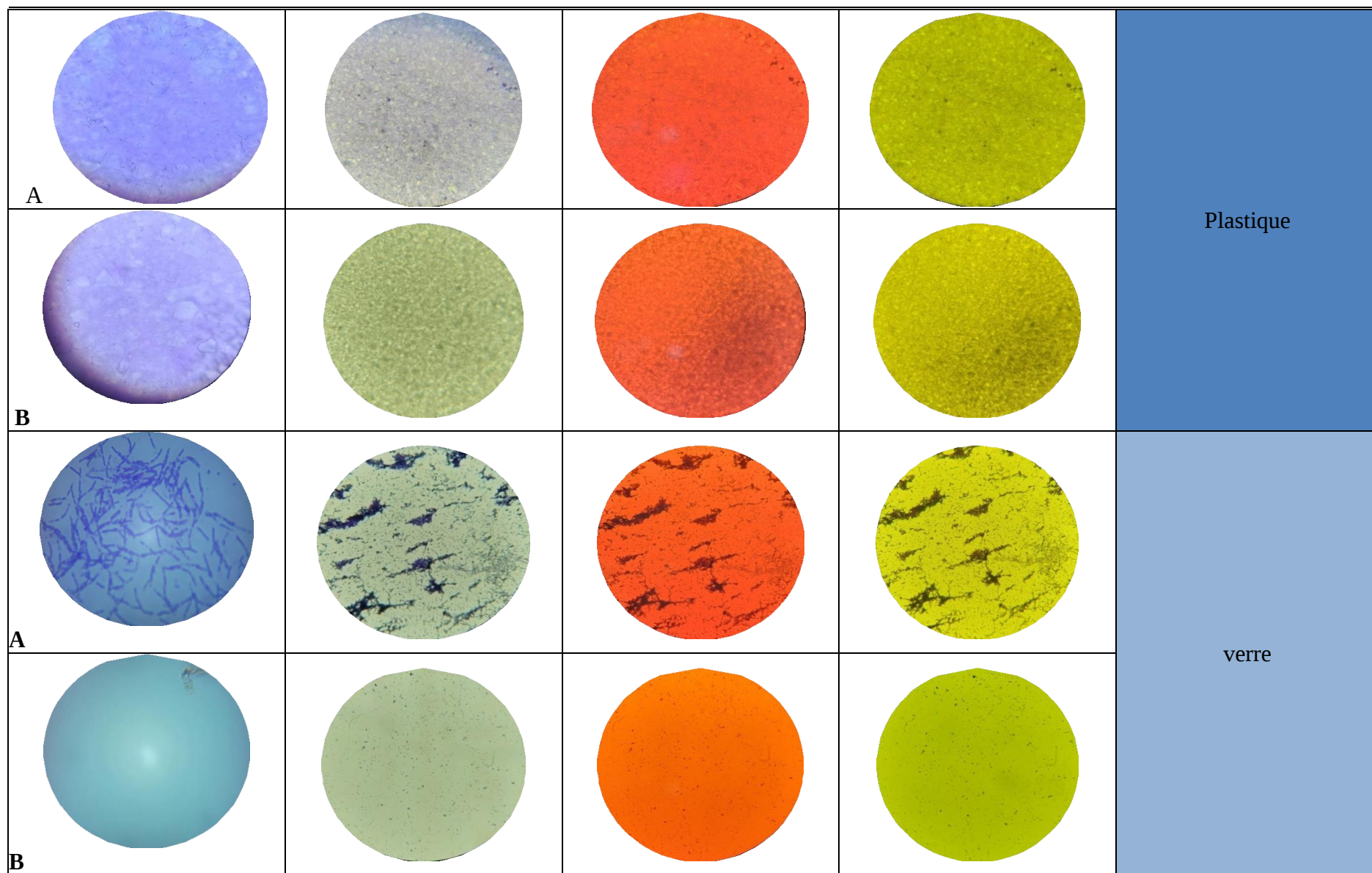


Figure 17 : Observation microscopique de l'adhésion microbienne sur les deux support (Grossissement x40) (A) culture de la souche 15, (B) Contrôle négatif.

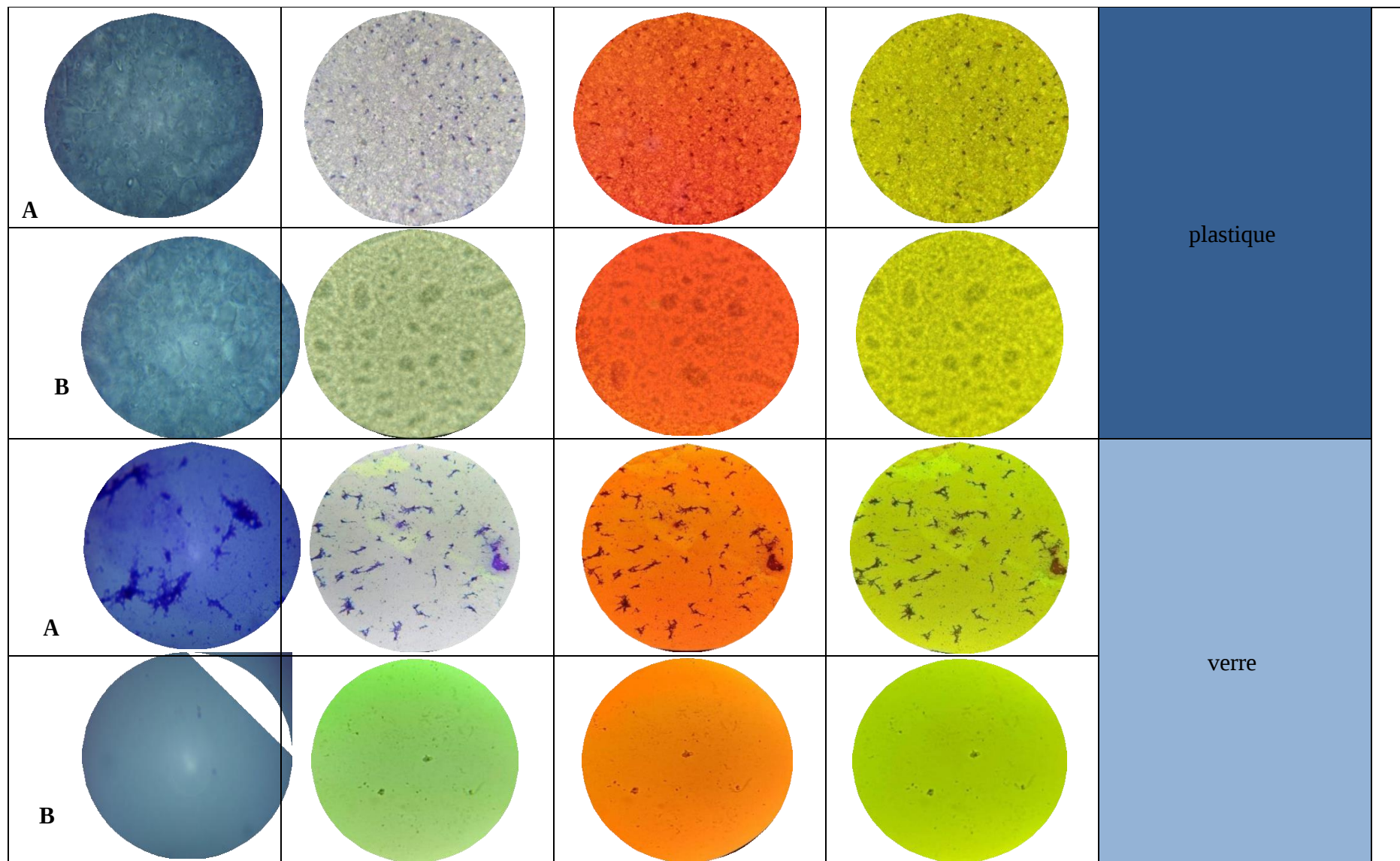


Figure 18 : Observation microscopique de l'adhésion microbienne sur les deux support (Grossissement x40)(A) culture de la souche, *Escherichia coli* ATCC 25912 (B) Contrôle négatif.

Conclusion

Le téléphone portable est largement utilisé dans la vie quotidienne, il est également utilisé dans les hôpitaux par le personnel soignant. Ceci peut entraîner un risque en raison de la transmission des microorganismes pathogènes dans les différents services de l'hôpital.

L'objectif principal de notre recherche est d'étudier l'adhésion des microorganismes ainsi que la formation des biofilms sur deux supports différents, verre et plastique ; ces deux surfaces sont les constituants extérieurs des téléphones portables du personnel.

Parmi les 25 souches, objets de cette étude, 84% ont présenté un potentiel de formation des biofilms, tandis que 88% d'entre elles avaient un caractère hydrophobe. Le test d'auto-agrégation a montré, par ailleurs, qu'il existe une différence au sein des mêmes espèces.

L'analyse statistique a montré une corrélation entre la formation des biofilms et l'hydrophobie des surfaces microbiennes. Cependant, aucune corrélation n'est trouvée entre l'auto-agrégation et le caractère formation des biofilms ou encore, entre l'auto-agrégation et l'hydrophobicité des surfaces bactériennes.

La totalité des souches testées ont présenté une adhésion au support verre plus importante que celle au support plastique. En effet, toutes les souches ont pu adhérer au verre, cependant, seulement 80 % ont présenté une adhésion sur le support plastique.

La séparation des souches en classe selon leurs taux d'auto agrégations réalisée via le paramètre des quartiles ($\leq 25\%$, $25 < - \leq 75\%$, $> 75\%$).

Les résultats de la séparation peuvent être pris en considération pour classer les souches selon leur taux d'auto-agrégation. De ce fait, nous proposons les intervalles suivants pour la réalisation de ces classements ($\leq 57\%$, $57 < - \leq 75\%$, $> 75\%$).

Comme perspective à cette étude, il serait souhaitable de :

- Nettoyage adéquat des surfaces des téléphones portables.
- Interdit de l'utilisation des téléphones portables dans les services hospitaliers

Références Bibliographique

1. Abdulla A.A. Abed T.A. Saeed A.M. (2014) Adhesion. autoaggrégation and hydrophobicity of six Lactobacillus strains. British Microbiology Research Journal .4(4) 381–391.
2. Annous B. Fratamico P. and Smith J.L. (2009) Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do, *Journal of Food Science*, Vol.74 No. 1, pp. 24–37.
3. Bakker D P . Busscher H J. Zanten J V. Vries JD. Klijnstra J W et van der Mei H C. (2004) Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment. *Microbiology* 150: 1779-1784.
4. Baillif S. Hartmann D. Freney J et Kodjikian L. (2010) Implant intraoculaire et adhésion bactérienne. influence des conditions environnementales .des propriétés bactériennes et des caractéristiques du matériau. *Journal français d'ophtalmologie*. 33 : 210-221.
5. Baudin M. (2017) Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. Thèse de doctorat: Biologie. France. Université Paris-Saclay .158p.
6. Bayoudh, S. A. Othmane .F. Bettaieb . A. Bakhrouf . H. Ben Ouada, et L. Ponsonnet. (2006) Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering*, 26: 300-305.
7. Bellon M.N. Mozes N. et al. (1990) "A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata". *Cell Biophysics*, 17, 93 106.
8. Bellon-Fontaine . M. N. O. Cerf (1991) Mechanisms of microorganism adhesion to surfaces: factors influencing the adhesion. *J. Industries alimentaire set agricoles*. 108:13-17.
9. Bendinger B. Rijnaarts H. H. Altendorf K. Zehnder A. J. (2003) Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*. 59(11) : 3973-3977.
10. Branger A. Richer M.M. Roustel S. (2007) Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
11. Bricha S. Ounine K et al. (2009) "Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*". *Revue Tunisienne d'infectiologie*, 2, 7–14.
12. Bronick, C. J. et Lal. R. (2005) Soil structure and management: areview. *Geoderma*124, 3-22.

- 13.** Bruinsma, G. M. H. C. van der Mei et H. J. Busscher. (2001) Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 22:3217-3224.
- 14.** Bourion, F. 1995. Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono- et bimicrobiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua*, thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire .Massy . France.
- 15.** Bujdáková H. Didiášová M. Drahovská H. and Černáková L. (2013) Role of cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* biofilm. *Central European Journal of Biology*, 8(3), 259-262.
- 16.** Bury-Moné S. (2007). "Les biofilms. PolycoPIé. Ecole Normale Supérieure de Cachan". 17 p.
- 17.** Busscher H.J. Rinastiti M. Siswomihardjo W. and Van Der Mei H.C. (2010) Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dental Research*, 89 (7), 657-665.
- 18.** Cappello S. and Guglielmino S.P. 2006. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Brazilian Journal of Microbiology* 37 . 205-207.
- 19.** Characklis W.G. (1973) «Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes". *Water Research* .7. 1249-1258.
- 20.** Characklis W.G. (1990). Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. Dans « Biofilms » (Characklis WG, Marshall KC eds). John Wiley and Sons. New York. p. 3-15.
- 21.** Christensen G.D., Simpson W.A et al. (1985). "Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices". *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 996–1006.
- 22.** Clutter buck AL. Woods EJ. Knottenbelt DC .Clegg PD. Cochrane CA. Percival SL. (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. 121 :1–17. **22.** Conly J.M., HILL S., POSS J. (1989). "Hand washing practices in ICU: the effects of an educational program and its relationship. 'to infection routes". *American journal of infection control*. 17(6) .330-9.
- 23.** Costa-Orlandi. C. Sardi. J. Pitangui. N. de Oliveira. H. Scorzoni. L. Galeane M. Medina-Alarcón. K. Melo. W. Marcelino M. Braz, J. Fusco-Almeida A. et MendesGiannini .M. (2017) Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *J. Fungi*.
- 24.** Costerton JW. Lewandowski Z. Caldwell DE. Korber DR and Lappin-Scott HM.

1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711–745.
25. Costerton J.W. Stewart P.S. Greenberg E.P. (1999) «Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*». 284. 1318–1322.
26. Costerton J W. Geesey G G, Cheng G K. (1978) How bacteria stick. *Scientific American* 238: 86-95.
27. Davey ME, Toole GAO. (2000) Microbial Biofilms : from Ecology to Molecular Genetics. 64(4):847–67.
28. Del Re. B. B. Sgorbati . M. Miglioli and D. Palenzona (2000) "Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*." *Letters in Applied Microbiology* 31(6): 438-442.
29. Di Bonaventura G. Spedicato I. D'Antonio D. Robuffo I. and Piccolomini R. (2004) Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:151–160.
30. Di Bonaventura. G. Stepanović. S. Picciani. C. Pompilio. A. and Piccolomini. R. (2007) Effects of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia Microbiologica*, 52(1), 86-90
31. Donlan RM. Costerton JW. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 167- 193.
32. Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8: 881–890
33. Dumas. C. (2007) Catalyse électro microbienne dans les piles à combustible. Thèse Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse, France.
34. Frank J.F. (2001) Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research*. 43 : 319-369.
35. Fraser S.L. Arnett Met Sinave C.P. (2010) *Enterobacter* Infections. Contributor Information and Disclosures. *medicine infectious diseases*. Editor .Cunha . B. A .State university of New York School of Medicine at Stony Brook.
36. Gallardo-Moreno. M. M. L. Gonzalez-Martin. C. Pérez-Giraldo, E. Garduno, J. M. Bruque, et A. A. C. Gomez-Garcia. (2002) Serum as a Factor Influencing Adhesion of *Enterococcus faecalis* on Glass and Silicone. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5784-5787.
37. GOTTENBOS .B. H.C. VAN DER MEI et H. J. BUSSCHER. (1999) Models for

studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology*, 310: 523-33.

38. Hall-Stoodley. L., Costerton .J.W. and Stoodley. P. (2004) Bacterial biofilms: from the environment to infectious disease. *Nat RevMicrobiol* 2: 95– 108.

39. Haras D. (2005) "Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention". *Matériaux& Techniques*, 93:27–41.

40. Heilmann S. Krishna S. Kerr B. (2015) Why do Bacteria regulate public goods by quorum sensing?-How the shapes of cost and benefit functions determine the form of optimal regulation. *Frontiers in Microbiology* 6:767.

41. Henerici A.T. (1933) "Studies of Fresh Water Bacteria: I.A Direct Microscopic Technique". *Journal of bacteriology*, 25(3), 277.

42. Heukelekian H. Heller A. (1940) Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology* 40: 547–58.

43. Hori K. Matsumoto S. (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* 48: 424-434.

44. Irie Y. Parsek M.R. (2008) "Quorum sensing and microbial biofilms". *Current Topicsin Microbiology and Immunology*, 322, 67- 84.

45. Jana T. K. A. K. Srivastava . K. Csery .et D. K. Arora. (2000) Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in nonspecific adhesion. *Can. J. Microbiol.*46:28–37.

46. Klausen M. Gjermansen M. Kreft J.U. Tolker-Nielsen T. (2006) Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilm. *FEMSMicrobiology Letters*. 261: 1-11.

47. Klausen M. Gjermansen M. Kreft J.U. et Tolker-Nielsen T. (2006) Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilm. *FEMSMicrobiology Letters*. 261: 1-11.

48. Kragh KN. Hutchison JB. Melaugh G et al. (2016) Role of multicellular aggregates inbiofilm formation. *MBio* 7: e00237-16.

49. Kragh KN. Hutchison JB. Melaugh G. et al. (2016) Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *MBio* 7: e00237-16.

50. Krepsky N. Ferreira R.B.R. Ferreira-Nunes A.P. Lins U.G.C. Silva-Filho F.C. de Mattos-Guaraldi A.L. and Netto-dos Santos K.R. (2003) Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis*Brazilian isolates. *Current*

Microbiology, 46, 280–286.

51. Kuchma S.L. Connolly .P. O'Toole G.A. (2005). A three-component regulatory system. *Lancet*. 358(9276): 135-138.

52. Kuhn, D. M. J. Chandra P. K. Mukherjee et M. A. Ghannoum. 2002. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity*. 70:878-888.

53. Kukavica-Ibrulj I.(2007) Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques .Université Laval. Québec, Canada.

54. Liu Y. Tay. J.-H. 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36: 1653–1665.

55. Lorite G S. Rodrigues C M. de Souza A A. Kranz C. Mizaikoff . B. et Cotta, M A. (2011) The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *Journal of Colloid and Interface Science* ; 359(1): 289–295.

56. Mathur T., Singhal S et al. (2006) "Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods". *Indian Journal of Medical Microbiology*. 24 (1) 25- 9.

57. Mattos-Guaraldi. A. L. Formiga .L. C. & Andrade. A. F. (1999) Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and non fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr Microbiol* 38, 37–42.

58. Mavrodi O.V. McSpadden Gardener B.B. Mavrodi. D.V. Bonsall R.F. Weller. D.M. and Thomashow, L.S., 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* **91**: 35–43.

59. McQueary C.N. Actis L.A. (2011) *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *Journal of Microbiology*. 49(2).243-250.

60. Monroe, D. (2007) Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms.

61. Muller A. et Guaguere E. (2014) L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. *Conflits AFVAC. Médecine interne / maladies infectieuses*. Paris - la Défense.

62. Nargis S., Amer I et al (2017) "Bacterial biofilm-based catheter-associated urinary tract infections: Causative pathogens and antibiotic resistance". *American Journal of Infection Control*. 45. 1101-1105.

63. Nadia BOUTALEB (2007) Etude de la formation de biofilms sur les Surfaces de

matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE-SUD. 194.

64. Neu T. R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol.Rev.* 60:151–166.

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

66. Oades, J. M. (1984) Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil* 76. 319-337.

67. Oades, J. M. (1993) The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma*, 23.

68. O'Toole GA .Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *MolMicrobiol* 30: 295–304.

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

70. O'Toole GA. Gibbs KA. Hager PW. Phibbs PV. and Kolter R. (2000)The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* .182: 425- 31.

71. Ouwehand A. C. S. Vesterlund. (2004) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S. A. von Wright A. Ouwehand, (eds.). *Lactic acid –bacteria. microbiology and functional aspects.*3rd edn. Marcel Dekker, New York, pp. 375– 395.

72. Pasmore M. Todd P. Smith S et al (2001) Effects of ultra filtration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling. *J MembSci* 194:15–32.

73. Pecastaings S. (2010) Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionellapneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

74. Peters T. serum albumin. *Advances in protein chemistry* (1985) 34 : P 161 – 171.

75. Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, Gherardi G, Verginelli F, et al.(2011) Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonasmaltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol* ; 11:159.

76. Qureshi Z.A. Paterson D.L. Pakstis D.L. Adams-Haduch J.M. Sandkovsky G. Sordillo E. Polsky B. Peleg A.Y. Bhussar M.K. et Doi Y. (2011) Risk factors and outcome of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream

infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37: 26–32.

77. Rasamiravaka T. LABTANI Q. DUEZ P. JAZIRIL M.E. (2015) The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International* 1.: 1-17.

78. Rebiahi S.A. Rahmouna M. Seddiki S.M.L et al., (2014) "Nosocomial infections caused by *staphylococcus aureus* biofilm producer in the neonatal unit of the hospital specialist mother-child of Telemcen, Algeria". *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 27: 228-235.

79. Ren D. Li C. Qin Y. Yin R. Du S. Ye F. LIU C. liuH. Wang M . Li L. Sun Y, Li X, Tian M, Jin N. (2014) *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*. 30 : 1-10.

80. Rickard A.H. Gilbert P. High N.J. Kolenbrander P.E. and Handley P.S. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi- species biofilms. *Trends Microbiol* 11. 94– 10.

81. ROUX A et GHIGO J.M. (2006) Les biofilms bactériens. communication. n°3. p. 261-268.

82. Sauer K. Camper A.K et al., (2002) "Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm";. *Journal Bacteriol*, 184, 1140- 1154.

83. Sheppard D.C. Howell P.L. (2016) Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from bacteria. *J. Biol. Chem*.

84. Sidi Mohammed Lahbib Seddiki. (2021) introduction aux biofilms microbiens. connaissances et savoirs. p75. Paris.

85. Singh R. Debarati F. Rakesh K J. (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14:389-397.

86. Six J. Bossuyt H. Degryze S. et Denef, K. (2004) A history of research on the link between (micro)aggregates. soil biota. and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research* 79: 7-31.

87. Spiers A.J. Bohannon J. Gehrig S.M., Rainey P.B. (2003) Biofilm formation at the air/liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*. 50 : 15-27.

88. Stanley N.R. Lazazzera B.A. Britton R.A. and Grossman A.D. (2003) Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarray. *Journal of Bacteriology*. 185: 1951-1957.

89. Stoodley P. Sauer K. Davies D.G. Costerton J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. Annual review of microbiology 56: 187–209.
90. Sutherland IW. (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology. 9(5). 222-227.
91. Tremblay Yannick D.N. Hathroubi S. et Jacques M. (2014) Les biofilms Bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. The canadian Journal of Veterinary Research. 78. 110-116.
92. Trunk T. Khalil HS .et Leo JC. Bacterial autoaggregation. AIMS Microbiol. (2018) 4(1):140-
93. Visick K.L. Schembri M.A. Yildiz F. Ghigo J.M. (2016) Biofilms 2015: multidisciplinary approaches shed light into microbial life on surfaces. J. Bacteriol.
94. Vu B. Chen M. Crawford R. J. and Ivanova, E. P. (2009), —Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formationl, Molecules, Vol. 14 No. 7. pp. 2535- 2554.
95. Yildiz F., Visck KL. (2009) "*Vibrio* biofilm: so much the same yet so different trends Microbiol" .17 .109-118.
96. Yuichi K., Miho N et al., (2013) Central intravenous catheter-related bacteremia dueto *Chryseobacterium indologenes*after cord blood transplantation . The Japanese journalofclinicalhematology,54(3),305-10.
97. Yi-Cheng C. Hsueh-Hsia L et al., (2015) Identification ‘epidemiologicalrelatedness‘ and biofilm formation of clinical *Chryseobacterium indologenes* isolatesfrom central Taiwan. Journal of Microbiology‘. Immunology and Infection. 48 : 559-564.
98. ZOBELL C.E (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity.Journal of Bacteriology 46:39-56.

Annexes

Annexe 1 : Tableau d'identification des souches prélevées des surfaces de téléphones portables du personnel soignant dans l'EPH de Naâma.

L'espèce identifiée	Références	Code d'identification
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA06/ PA07/PA17/ PA 22	2202000
<i>Aeromonas Salmonicida Ssp. Salmonicida</i>	AS01/AS02/ AS03	2006300
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PF13/PF16/PF19/PF20/PF21/PF23/ PF24/PF25	2003000
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	CI09	1252000
<i>Vibrio fluvialis</i>	VF15	3046001
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SM10	1002000
<i>Cronobacter Spp.</i>	CS04CS14	3345773 3307133
<i>Enterobacter cloacae</i>	EC05EC08EC11EC12EC18	3307773 2307773 3306773 3307573 3306373

Annexe 2 : Préparation de solutions et milieu de culture

• Solutions

Cristal violet (5%)

violet de gentiane..... 0.5 g

Eau distillée 100 ml

☐

Solution éthanol (95%)

Ethanol 99%... 100 ml

L'eau distillé.....5.15ml

☐

Acide acétique

Acide pure..... 50ml

L'eau distillé...200ml

☐

L'eau physiologie

NACL... 9g L'eau distillé... 500ml

• Milieux de culture

☐

Milieu gélose nutritif

gélose nutritif...28g

Eau distillée 1000 ml

☐

Bouillon nutritif

Bouillon nutritif...4g

L'eau distillé...500ml

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes

☐

Le tampan PBS (Phosphate Buffered Saline) , pH= 7,2± 2

Na Cl..... 8g Kcl... 0.2g

KH₂PO₄ 0.24g

Na₂HPO₄... 1.42

Dans un litre d'eau distillée. Eau distillée 1 L Stérilisation à l'autoclave : 121°

Annexe3 : Tableau de quantification des biofilms formés par des souches prélevées del'EPH de Naâma selon la méthode au cristal violet.

Souche	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Moyenne	Erreur standard des moyennes	Erreur moyenne, min
AS1	0,033	0,035	0,04	0,036	0,00208167	0,036±0.00208167
AS2	0,064	0,017	0,013	0,031	0,0163741	0,031±0.0163741
AS3	0,042	0,067	0,062	0,057	0,00763763	0,057±0.00763763
CS4	0,076	0,03	0,024	0,043	0,01642491	0,043±0.016491
EC5	0,041	0,066	0,073	0,060	0,00971253	0,060±0.00971253
PA6	0,062	0,056	0,03	0,049	0,00982061	0,049±0.00971253
PA7	0,033	0,085	0,04	0,053	0,01629247	0,053±0.01629247
EC8	0,046	0,004	0	0,017	0,01471205	0,017±0.01471205
CI9	0,045	0,0122	0,077	0,045	0,01870662	0,045±0.01870662
SM10	0,046	0,046	0,008	0,033	0,01266667	0,033±0.01266667
EC11	0,16	0,241	0,159	0,187	0,0271682	0,187±0.0271682
EC12	0,036	0,032	0,04	0,036	0,0023094	0,036±0.0023094
PF13	0,023	0,029	0,028	0,027	0,00185592	0,027±0.00185592
CS14	0,016	0,025	0	0,014	0,00731057	0,014±0.00731057
VF15	0,067	0,103	0,091	0,087	0,01058301	0,087±0.01058301
PF16	0,092	0,058	0,062	0,071	0,01072898	0,071±0.01072898
PA17	0,059	0,066	0,063	0,063	0,00202759	0,063±0.0020759
EC18	0,025	0,02	0,013	0,019	0,0034801	0,019±0.0034801
PF19	0,059	0,12	0,087	0,089	0,01762889	0,089±0.01762889
PF20	0,045	0,047	0,045	0,046	0,00066667	0,046±0.00066667
PF21	0,118	0,094	0,073	0,095	0,013	0,095±0.013
PA22	0,055	0,044	0,043	0,047	0,00384419	0,047±0.00384419
PF23	0,03	0,032	0,027	0,030	0,00145297	0,030±0.00145297
PF24	0,091	0,09	0,112	0,098	0,00717248	0,098±0.00717248
PF25	0,041	0,052	0,036	0,043	0,00472582	0,043±0.00472582
BS	0,045	0,041	0,058	0,048	0,0051316	0,048±0.0051316
E. coli	0,042	0,049	0,042	0,044	0,00233333	0,044±0.00233333

Annexes 4 : Evaluation de la formation des biofilms à l'œil nu.

Souches	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3
AS1	++	+++	++
AS2	++	++	-
AS3	+++	+++	+++
CS4	+++	+++	+++
CS14	-	-	-
EC5	+++	+++	+++
EC8	-	-	-
EC11	+++	+++	+++
EC12	++	++	++
EC18	-	-	-
PA6	++	++	++
PA7	++	++	+++
PA17	+++	+++	+++
PA22	++	++	++
PF13	-	-	-
PF16	+++	+++	+++
PF19	++	+++	+++
PF20	++	++	++
PF21	+++	++	+++
PF23	++	++	++
PF24	+++	+++	++
PF25	++	++	++
CI9	++	++	++
SM10	++	++	++
VF15	+++	+++	+++
BS	++	++	++
E. coli	++	++	++

+++ : Bonne formatrice du biofilm

++ : Modérément formatrice du biofilm

- : Non formatrice du biofilm.

Annexes 5 : Tableau d'évaluations d' hydrophobicité des souches étudiées selon la méthode MATS.

Souche	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Hydrophobie %	Erreur standard des moyennes	Erreur moyenne, min
AS1	0,04	0,062	0,06	46	0,0702376 9	0,054 ± 0,07023769
AS2	0,037	0,033	0,039	62	0,0300821 9	0,03633 ±0,0300821 9
AS3	0,008	0,007	0,063	70	0,2347441 4	0,026 ±0,2347441 4
CS4	0,052	0,05	0,057	36	0,0456177 1	0,053 ±0,0456771 1
EC5	0,008	0,009	0,01	90	0,0136422 5	0,009 ±0,0136422 5
PA6	0,048	0,045	0,049	49	0,0448454 1	0,0473 ±0,0448454 1
PA7	0,06	0,058	0,05	38	0,0339450 1	0,056 ±0,0339450 1
EC8	0,08	0,083	0,085	1	0,0270308 5	0,0826 ±0,0270308 5
CI9	0,048	0,046	0,05	45	0,0120370 4	0,048 ±0,0120370 4
SM10	0,058	0,062	0,059	25	0,0150231 3	0,0596 ±0,0150231 3
EC11	0,038	0,035	0,038	59	0,0302940 5	0,037 ±0,030294 05
EC12	0,049	0,048	0,043	44	0,0429758 3	0,0466 ±0,042975 83
PF13	0,088	0,086	0,087	9	0,0377032 7	0,087 ±0,037703 27
CS14	0,097	0,095	0,097	3	0,0843644 5	0,0963 ±0,084364 45
VF15	0,036	0,03	0,035	60	0,0230367 7	0,0336 ±0,023036 77
PF16	0,016	0,018	0,016	83	0,0066666 7	0,0166 ±0,006666 67

PA17	0,016	0,008	0,006	90	0,0305505	0,01 ±0,0305505
EC18	0,065	0,063	0,058	28	0,0413491	0,062 ±0,0413491
PF19	0,031	0,035	0,033	65	0,0168531 2	0,033 ±0,0168531 2
PF20	0,05	0,048	0,043	50	0,0584760 2	0,047 ±0,0584760 2
PF21	0,006	0,01	0,008	92	0,0096864 4	0,008 ±0,0096864 4
PA22	0,041	0,039	0,041	52	0,0164791 4	0,0403 ±0,0164791 4
PF23	0,074	0,074	0,067	21	0,0740719 9	0,0716 ±0,0740719 9
PF24	0,004	0,008	0,01	91	0,0220479 3	0,0073 ±0,0220479 3
PF25	0,042	0,039	0,04	54	0,0288823 6	0,040 ±0,0288823 6
BS	0,055	0,052	0,051	41	0,0258140 8	0,052 ±0,0258140 8
E. coli	0,053	0,053	0,05	46	0,0261078 3	0,052 ±0,0261078 3

Annexes 6 : Tableau d'évolution de l'auto agrégation au cours du temps.

SOUCHE	30 min	60min	90min	120 min	24 h
AS1	94%	91%	85%	48%	14%
AS2	91%	87%	76%	67%	52%
AS3	93%	92%	89%	22%	74%
CS4	93%	94%	90%	94%	87%
EC5	71%	68%	83%	73%	55%
PA6	95%	92%	89%	88%	74%
PA7	91%	91%	90%	45%	89%
EC8	94%	89%	89%	78%	75%
CI9	90%	89%	85%	82%	85%
SM10	96%	95%	97%	97%	88%
EC11	90%	90%	88%	87%	82%
EC12	92%	91%	90%	88%	84%
PF13	97%	97%	96%	87%	10%
CS14	67%	59%	34%	32%	3%
VF15	88%	91%	93%	89%	71%
PF16	96%	96%	95%	89%	86%
PA17	95%	96%	94%	87%	59%
EC18	83%	82%	84%	53%	11%
PF19	97%	96%	97%	94%	96%
PF20	98%	97%	94%	91%	75%
PF21	57%	57%	90%	82%	86%
PA22	94%	89%	87%	83%	81%
PF23	91%	93%	90%	87%	88%
PF24	80%	76%	77%	69%	68%
PF25	67%	45%	44%	40%	39%
BS	87%	85%	70%	65%	61%
E. coli	96%	89%	94%	89%	98%

Annexes 7 : Tableau d'évaluations de l'auto-agrégation des souches étudiées.

souche	Répétition n1	Répétition n2	Répétition n3	Moyenne	Auto- aggrégation	Erreur standard des moyennes	Erreur moyenne, min
AS1	0,26	0,25	0,25	0,2533333	14	0,96259142	0,253333 +/- 0,96259142
AS2	0,083	0,1	0,083	0,0886667	52	9,0558063	0,08866667 +/- 9,0558063
AS3	0,085	0,072	0,08	0,079	74	1,2260684	0,079 +/- 1,2260684
CS4	0,04	0,042	0,039	0,0403333	87	0,3053177	0,04033333 +/- 0,3053177
EC5	0,053	0,051	0,05	0,0513333	55	0,865203	0,05133333 +/- 0,865203
PA6	0,078	0,07	0,068	0,072	74	0,8677354	0,072 +/- 0,8677354
PA7	0,018	0,022	0,023	0,021	89	0,3256871	0,021 +/- 0,3256871
EC8	0,068	0,064	0,072	0,068	75	0,8329951	0,068 +/- 0,8329951
CI9	0,024	0,027	0,021	0,024	85	1,1304872	0,024 +/- 1,1304872
SM10	0,086	0,083	0,079	0,0826667	88	0,3404997	0,08266667 +/- 0,3404997
EC11	0,04	0,043	0,043	0,042	82	0,8008969	0,042 +/- 0,8008969
EC12	0,045	0,044	0,049	0,046	84	0,5440205	0,046 +/- 0,5440205
PF13	0,73	0,75	0,68	0,72	10	3,3367734	0,72 +/- 3,3367734
CS14	0,089	0,1	0,097	0,0953333	3	2,3890754	0,09533333 +/- 2,3890754
VF15	0,065	0,065	0,063	0,0643333	71	0,340994	0,06433333 +/- 0,340994
PF16	0,067	0,066	0,065	0,066	86	0,2028745	0,066 +/- 0,2028745
PA17	0,186	0,188	0,184	0,186	59	0,3090445	0,186 +/- 0,3090445
EC18	0,13	0,14	0,1	0,1233333	11	6,549725	0,12333333 +/- 6,549725
PF19	0,042	0,043	0,043	0,0426667	96	0,0240857	0,04266667 +/- 0,0240857
PF20	0,162	0,165	0,162	0,163	75	0,1542014	0,163 +/- 0,1542014

PF21	0,065	0,06	0,063	0,0626667	86	0,3277014	0,06266667+/- 0,3277014
PA22	0,079	0,072	0,077	0,076	81	0,5131334	0,076+/- 0,5131334
PF23	0,034	0,032	0,037	0,0343333	88	0,4823761	0,03433333+/-
PF24	0,025	0,021	0,027	0,0243333 3	68	3,36388194 0	0,02433+/- 3,36388194
PF25	0,232	0,236	0,234	0,234	39	0,4205	0,243+/-0,4205
BS	0,043	0,045	0,042	0,0433333 3	61	0,4818	0,043333+/-0.481 8
E. coli	0,004	0,006	0,003	0,0043333	98	0,3585234	0,00433333+/- 0,3585234

Annexe 8 : Tableau de l'adhésion microbienne sur le support verre et plastique des souches étudiées

Souche	Plastique	Verre
AS3	Non plastique	Verre
PA7	Plastique	Verre
CI9	Plastique	Verre
EC11	Plastique	Verre
EC12	Plastique	Verre
PF13	Plastique	Verre
VF15	Non plastique	Verre
PF16	Plastique	Verre
PA17	Plastique	Verre
EC18	Plastique	Verre
E. coli	Plastique	Verre
BS	Plastique	Verre