

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la terre et de l'Univers
Département de Biologie

Polycopié pour le Master I : Biologie moléculaire et cellulaire

Interactions microbiennes

Elaboré par : Dr. Sandra AMRI

Année universitaire : 2019/2020

Table des matières

Page

Liste des figures

Liste des tableaux

Chapitre I : Interactions entre microorganismes et milieu physique

I.1. Ecologie des microorganismes dans les milieux simples et complexes.....	01
I.1.1. Ecosystème simple.....	01
I.1.2. Ecosystème complexe.....	02
I.1.3. Sol : milieu complexe et bioréacteur microbien.....	02
I.1.3.1. Effet du sol sur les microorganismes.....	03
I.1.3.2. Effet des microorganismes sur le sol.....	05
I.2. Organisation spatiale de la communauté microbienne et biofilms.....	06
I.2.1. Définition des biofilms.....	07
I.2.2. Composition de la matrice extracellulaire.....	07
I.2.2.1. Polysaccharides.....	07
I.2.2.2. Protéines.....	08
I.2.2.3. Acides nucléiques.....	08
I.2.2.4. Autres molécules.....	08
I.2.3. Organisation et rôle de la matrice extracellulaire.....	08
I.2.4. Structure de résistance.....	09
I.2.4.1. Limitation de la diffusion.....	09
I.2.4.2. Phénotype spécifique du biofilm régulé par quorum-sensing.....	10
I.2.4.3. Hétérogénéité phénotypique.....	11
I.2.4.4. Hétérogénéité génétique.....	11
I.2.5. Cinétique du développement des biofilms.....	12
I.2.5.1. Initiation d'un biofilm.....	12
I.2.5.2. Formation et maturation des structures.....	15
I.2.5.3. Dispersion du biofilm.....	19
I.2.6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	21
I.2.6.1. Paramètres hydrologiques.....	21
I.2.6.2. Température.....	21
I.2.6.3. Eclairage.....	21
I.2.6.4. Nature des supports de colonisation.....	21
I.2.6.5. Facteurs biologiques.....	22
I.2.6.6. Effets des nutriments.....	22
I.3. Etat viables non cultivables.....	23
I.3.2. Bactérie viable non cultivable.....	23
I.3.3. Facteurs influençant l'état VNC.....	25
I.3.3.1. Carence en nutriments.....	25
I.3.3.2. Influence de la température.....	25
I.3.3.3. Influence de la teneur en oxygène dissous.....	26
I.3.3.4. Influence du pH.....	26
I.3.3.5. Influence de la salinité.....	26
I.3.3.6. Traitements oxydants.....	27
I.3.4. Modifications physiologiques et morphologiques.....	27
I.3.5. Virulence.....	28
I.3.6. Ressuscitation.....	28

Chapitre II : Interactions entre microorganismes

II. 1. Signaux et communication.....	30
II. 2. Quorum sensing bactérien.....	31
II. 2.1. Phénotypes régulés par quorum sensing chez les bactéries.....	31
II.2.1.1. Nodulation.....	32
II.2.1.2. Facteur de virulence.....	32
II.2.1.3. Mobilité bactérienne.....	32
II.2.1.4. Fructification.....	33
II.2.1.5. Transfert d'ADN.....	33
II.2.1.6. Biofilm.....	33
II.2.1.7. Produits extracellulaires.....	34
II.2.1.8. Incorporation du phosphore.....	34
II.2.1.9. Morphologie cellulaire.....	34
II.2.1.10. Bioluminescence.....	34
II.2.2. Molécules signal chez les bactéries.....	35
II.3. Interactions et dynamique des populations microbiennes.....	37
II.3.1. Définition.....	37
II.3.2. Cinétique de croissance des populations bactériennes.....	37
II.4. Succession microbienne : conséquence pour la biodégradation des composés organiques et en agronomie.....	39
II.4.1. Succession microbienne.....	39
II.4.2. Conséquence pour la biodégradation des composés organiques et en agronomie....	40
II.4.2.1. Activités microbiennes dans les sols.....	40
II.4.2.2. Processus généraux de biodégradation des composés organiques.....	41

Chapitre III : Interactions avec les organismes supérieurs

III.1. Différents interactions biologiques.....	44
III.1.1. Parasitisme.....	45
III.1.2. Symbiose.....	45
III.1.2.1. Commensalisme.....	45
III.1.2.2. Mutualisme.....	46
III.1.3. Compétition.....	46
III.1.4. Cométabolisme.....	47
III.2. Interactions micro-organismes / végétaux.....	47
III.2.1. Symbiose légumineuse.....	47
III.2.1.1. Fixateurs d'azotes symbiotiques.....	47
III.2.1.2. Rhizobia.....	48
III.2.2. Processus de colonisation.....	48
III.2.2.1. Phase de pré-infection de la racine.....	48
III.2.2.2. Infection et la genèse du nodule.....	49
III.2.2.3. Phase de maturation nodulaire ou phase intracellulaire.....	50
III.2.2.4. Phase de dégénérescence.....	51
III.2.3. Agrobactéries.....	51
III.2.3.1. Plasmide Ti et pathogénie.....	51
III.2.3.2. Processus de colonisation.....	53
III.2.4. Impact écologique des OGM.....	54
III.3. Interactions microorganismes / animal et homme.....	55
III.3.1. Flore microbienne normale.....	55
III.3.2. Principale flore de l'Homme.....	57
III.3.2.1. Peau.....	58
III.3.2.2. Appareil respiratoire.....	58
III.3.2.3. Appareil digestif.....	59
III.3.2.4. Appareil uro-génital.....	60
III.3.3. Base du pouvoir pathogène.....	60

III.3.3.1. Virulence.....	61
III.3.3.2. Notion de réservoirs naturels.....	65
Références bibliographiques.....	67

Liste des Figures

N°	Titre	Page
01	Interaction entre vivant et les différents constituants.....	03
02	Etape du développement d'un biofilm bactérien.....	12
03	Structure et rôle des différentes fonctions physiologiques du c-di-GMP.....	14
04	Formation d'un biofilm microbien.....	16
05	Courbe de croissance bactérienne et ses différentes phases.....	38
06	Principale phases de la courbes de croissances bactérienne.....	39
07	Schéma général de l'activité microbienne.....	40
08	Formation d'un nodule de racine dans une légumineuse infectée par Rhizobium.....	49
09	Régions du plasmide Ti.....	52
10	Impacts écologiques attribués aux OGM.....	55

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Biotransformation des microorganismes du sol.....	06
02	Condition de formation et de réveil de l'état VNC chez différents bactéries.....	24
03	Optima des conditions environnementales pour la croissance microbienne.....	41
04	Principales interactions biotiques.....	44
05	Flore normale de diverses parties du corps humain.....	57
06	Facteurs de virulence portés par les plasmides.....	62
07	Facteurs d'adhésions bactériennes impliquées à l'attachement à la cellule hôte.....	63
08	Enzymes bactériennes facilitant l'invasion de l'hôte.....	64

Chapitre I : Interactions entre microorganismes et milieu physique

I.1. Ecologie des microorganismes dans les écosystèmes simples et complexes

Il y a deux types principaux d'environnement pour les microorganismes, chacun de ces deux types à sa propre flore microbienne :

I.1.1. Écosystème simple

L'écosystème simple est représenté par le milieu aquatique, le milieu marin représente 97 % des eaux disponibles à la surface de la planète, la plus grande partie est en haute mer, c'est-à-dire à des profondeurs supérieures à 300 mètres et à des températures proches de 4° C où seuls des organismes barophiles, psychrophiles, non phototrophes et le plus souvent microaérobies ont des chances de survivre [1]. Les océans sont le domaine des microorganismes décomposeurs dont le rôle est de décomposer les organismes morts qui sédimentent depuis les couches superficielles jusqu'aux fonds abyssaux. Dans les zones éclairées, les populations de microorganismes sont plus complexes, elles sont dominées par les populations du phytoplancton et du zooplancton. Ces derniers peuvent être colossales en certains points (plateaux continentaux, zones estuariennes,...) ou quasi inexistantes (bleus équatoriaux, courants chauds). En certains points des fonds océaniques, au contact le plus souvent des zones de subduction des plaques océaniques, se développent des flores bactériennes très particulières thermophiles extrêmes qui vivent en relation symbiotique avec des vers et autres animaux adaptés (Sigee, 2005 ; Mardigan et Martinko, 2007).

Les lacs et les rivières seront d'autant plus riches en microorganismes qu'ils seront plus riches en éléments nutritifs. Les lacs oligotrophes seront pauvres en plancton et en bactéries, par contre les lacs eutrophes ou dystrophes seront plus riches et pourront même connaître, occasionnellement, des explosions démographiques de microorganismes qui, à terme, leur seront préjudiciables (fleurs d'eau des cyanobactéries, développement intempestif de diverses algues unicellulaires) (Sigee, 2005). Les algues sont des producteurs primaires, elles constituent les ressources nutritives des consommateurs primaires, telles que les protozoaires et les petits crustacés comme les puces d'eau (*Daphnia sp*). Ces consommateurs primaires servent à leur tour de nourriture aux consommateurs secondaires qui deviennent eux-mêmes la proie de consommateurs tertiaires et ainsi de suite. Les bactéries hétérotrophes dégradent l'excédent de matières organiques produites par les algues et décomposent les restes des algues mortes et des autres organismes qui peuplent le milieu aquatique. Ces bactéries sont dites minéralisatrices, car elles assurent la conversion des matières organiques en matières inorganiques qui peuvent

être recyclées. La plupart des bactéries hétérotrophes qui font partie du plancton aquatique sont qualifiées d'oligotrophes, car elles peuvent se développer en présence de très faibles concentrations de substances organiques (**Perry *et al.*, 2004 ; Mardigan et Martinko, 2007**).

I.1.2. Écosystème complexe

L'écosystème complexe est représenté par le milieu terrestre, les sols forment des environnements complexes, composés de matières minérales provenant de l'érosion des roches et des matières organiques ou humus. L'humus contient les produits de décomposition partielle des végétaux ainsi que certaines matières végétales peu dégradables dites réfractaires comme la lignine ou les acides humiques. Contrairement aux milieux aquatiques, l'eau n'est pas toujours disponible dans le sol, elle est indispensable aux développements de tous les organismes. La croissance des microorganismes rencontrés dans le sol n'est donc possible que de manière intermédiaire, lorsque le taux d'humidité est suffisant. Les microorganismes ont développé des stratégies pour s'adapter aux périodes sèches. Certaines produisent des cystes (*Azotobacter* et myxobactéries), des endospores (*Clostridium* et *Bacillus*) ou des conidiospores (Actinomycètes). Dans le sol les producteurs prédominants sont les végétaux qui synthétisent des composés organiques complexes insolubles dans l'eau et réfractaires à la décomposition. Néanmoins, les bactéries hétérotrophes et les champignons sont capables de dégrader ces substances. Ils jouent un rôle majeur dans les cycles des nutriments des sols. Par exemple, la production de nutriments provient de la dégradation de la matière organique, de même d'importante réaction du cycle d'azote se déroule dans le sol. La fixation d'azote symbiotique ou non symbiotique et l'ammonification sont des exemples de la transformation de l'azote (**Perry *et al.*, 2004 ; Mardigan et Martinko, 2007**).

I.3. Sol : milieu complexe et bioréacteur microbien

D'un point de vue pédologique, le sol est la partie superficielle de l'écorce terrestre fortement soumise à l'action des agents climatiques et biologiques. C'est un milieu poreux, triphasique et organisé, composé de trois phases inertes respectivement solide, liquide et gazeuse. Les proportions entre ces différentes phases peuvent varier dans le temps. Aux trois phases inertes s'ajoutent un compartiment vivant (**Stengel et Gelin, 1998**). Ces quatre compartiments interagissent entre eux et sont le siège de nombreuses réactions biophysicochimiques (**Figure 01**).

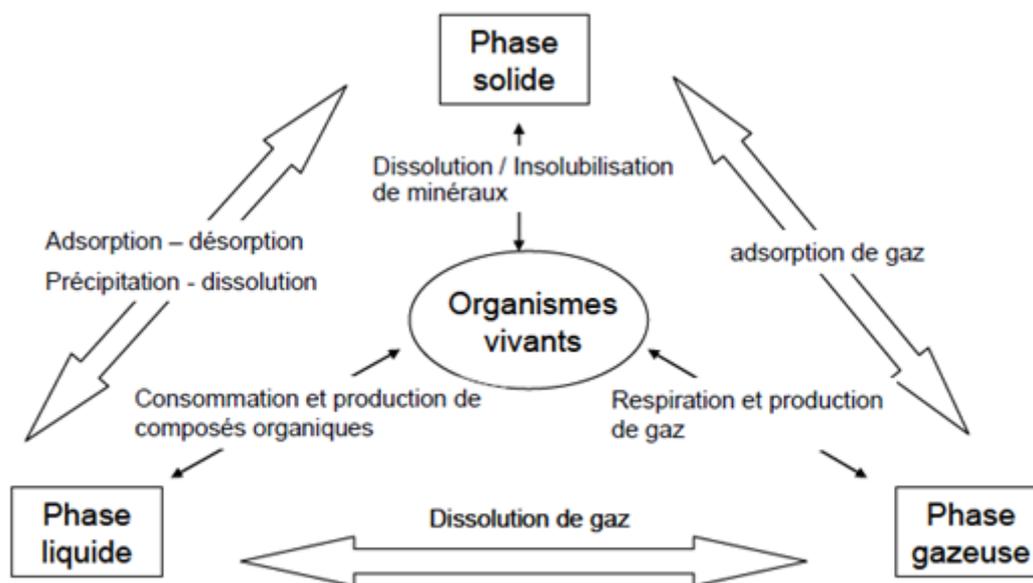


Figure 01 : Interaction entre vivant et les différents constituants (Calvet, 2003).

Les organismes vivants du sol sont représentés par les bactéries (25 %), les champignons (59 %), la microfaune (12 %), les protozoaires (4 %) et les algues (proportion très faible). Les bactéries représentent les microorganismes les plus abondants dans le sol en densité et en nombre, même si les champignons représentent une quantité de biomasse plus importante. Les microorganismes du sol sont aujourd'hui reconnus comme étant un des facteurs clé dans l'évolution des sols. Les différents composants inertes d'un sol (phases solide, liquide et gazeuse) sont en étroite relation avec le 4^{ème} composant que sont les organismes vivants (Gobat *et al.*, 1998).

1.3.1. Effet du sol sur les microorganismes

L'eau est indispensable à la vie et sa teneur dans le sol a des effets sur les microorganismes présents. Abondante, elle augmente la disponibilité des substrats et facilite les déplacements des microorganismes ; rare, elle facilite les échanges gazeux avec l'atmosphère. Un assèchement du sol a pour conséquence une mortalité partielle des populations et la réduction des activités microbiennes, alors que la réhydratation entraîne une reprise rapide de l'activité microbienne (Gobat *et al.*, 1998). La saturation en eau, si elle persiste, entraîne la disparition progressive de l'O₂ suite à sa consommation et sa faible diffusion depuis la surface en milieu liquide. Elle modifie alors profondément les équilibres biologiques, les microorganismes aérobies régressent

et cèdent la place aux microorganismes anaérobies. La composition de cette eau a aussi un impact important sur les microorganismes du sol. En effet, certaines espèces ont des effets d'inhibition sur les activités microbiennes anaérobies. Par exemple, l'effet inhibiteur de NO_2^- sur de nombreux catabolismes : fermentation, réduction du Fe (III) et des sulfates, et la méthanogenèse (Achnich *et al.*, 1995 ; Weber *et al.*, 2006). L'inhibition est généralement due aux effets toxiques des produits intermédiaires de la dénitrification (NO_2^- , NO et N_2O). En outre, les donneurs et accepteurs d'électrons nécessaires aux réactions d'oxydo-réduction doivent être biodisponibles. Or, la biodisponibilité de ces composés est affectée entre autre, par le pH de la solution, facteur déterminant dans la spéciation chimique des éléments. Par ailleurs, le pH a aussi un impact sur la distribution des microorganismes, la majorité des bactéries prédominent dans des sols neutres ou légèrement alcalins, alors que les champignons prédominent plutôt dans des environnements acides. De plus, des variations drastiques de pH peuvent également détruire la membrane plasmique ou inhiber l'activité d'enzymes ou de protéines membranaires de transport (Prescott *et al.*, 2003).

L'atmosphère gazeuse a un impact important sur la composition microbienne du milieu, le renouvellement de l' O_2 consommé dans le sol est assuré par la diffusion du gaz à partir de l'atmosphère extérieure et dépend à la fois de la teneur en eau du sol et de la porosité de la phase solide. Toutefois, un grand nombre de bactéries aérobies et de champignons sont capables de se développer en l'absence d' O_2 , tant que le potentiel d'oxydo-réduction reste oxydant, c'est-à-dire suffisamment élevé pour que d'autres accepteurs d'électrons soient disponibles. Certaines études ont montré que le CO_2 était nécessaire pour la croissance de quelques bactéries et champignons, notamment dans les processus de fermentations (Picek *et al.*, 2000), alors que d'autres études ont montré que le CO_2 limitait la croissance des microorganismes et inhibait certaines enzymes. La présence d' H_2 dans les sols a aussi un impact sur les processus microbiologiques anaérobies. D'une part la présence d' H_2 dans le sol est indispensable à certaines activités telles que l'homoacétogenèse, la réduction du fer ou des sulfates. D'autre part, c'est un facteur thermodynamique limitant pour les réactions d'acétogenèse impliquant l'éthanol, le propionate, le butyrate et le benzoate (Dassonville *et al.*, 2002).

La phase solide du sol est un élément important vis-à-vis des microorganismes, elle agit également comme un tampon vis-à-vis des variations de pH du milieu, protégeant ainsi les microorganismes. Dans un sol calcaire, la production de CO_2 induit une dissolution de la calcite, minimisant ainsi la dissolution de H_2CO_3 en H^+ et HCO_3^- (Sigg *et al.*, 2000). L'acidification des sols induit une dissolution des hydroxydes métalliques, engendrant la

mobilisation d'éléments métalliques. En outre, dans le sol, il existe des enzymes, extracellulaires ou libérées lors de la lyse des cellules, indispensables pour certains microorganismes, incapables d'ingérer des macromolécules. Ces enzymes sont généralement adsorbées à la surface des composants de la phase solide (argiles, composés humiques). Ces composants de la phase solide agissent alors comme protecteur et stabilisant vis à vis des variations physico-chimiques du milieu et de la dégradation par d'autres enzymes (protéase) De plus, la matière organique est une source importante de donneur d'électrons pour les microorganismes (Gobat *et al.*, 1998).

I.3.2. Effet des microorganismes sur le sol

Les microorganismes affectent directement le pH du sol via les activités microbiologiques. De manière assez générale, l'accumulation de CO₂ et d'acides organiques aura tendance à acidifier le milieu ; par ailleurs les réductions microbiennes de Fe(III) et Mn(IV) auront tendance à l'alcaliniser suite à la plus grande mobilité des ions réduits Fe²⁺ et Mn²⁺ que des ions oxydés Fe³⁺ et Mn⁴⁺ (ou Mn³⁺). De la même façon, mais pour d'autres raisons, les réductions des oxydes de azote et des oxydes de Soufre auront tendance à alcaliniser le milieu. Les activités microbiologiques affectent également le niveau redox du sol. Lorsque le sol évolue après un passage de conditions aérées à des conditions anoxiques, les microorganismes utilisent successivement différents accepteurs d'électrons (**Tableau 01**) et affectent potentiellement le potentiel d'oxydoréduction (E_H) du sol au travers de très nombreux couples oxydant/réducteur : NO₃⁻/NO₂⁻, NO₂⁻/N₂O, N₂O/N₂, Mn(IV)/Mn(III), Mn(III)/Mn²⁺, Fe(III)/Fe²⁺, H⁺/H₂, SO₄²⁻/HS⁻, CO₂/CH₄etc. L'évolution du E_H telle qu'elle peut être observée résulte alors de l'évolution réelle de chacun de ces couples. L'utilisation simultanée de différents accepteurs d'électrons peut être le fait de microorganismes aux possibilités multiples ou de bactéries différentes présentant au même instant des fonctionnements différents. Le déclenchement d'une réaction d'oxydo-réduction dépend très généralement de la disponibilité en substrats, voire de préférences pour certains substrats s'ils sont présents, de compétitions entre métabolismes pour les mêmes substrats et d'inhibitions variées. Par exemple, en condition réductrice, la compétition vis-à-vis de l'H₂ a été largement étudiée. L'H₂ est le donneur d'électrons pour la réduction des sulfates, du fer et la production de méthane. Il semble que les bactéries nitrato-réductrices soient également capables d'utiliser l'H₂ et donc soient un compétiteur pour les trois processus précédents. De plus, les processus de réduction du Fer et du sulfate peuvent également suffisamment diminuer l'H₂ du milieu pour que la méthanogenèse

ne soit thermodynamiquement plus réalisable (Achnich *et al.*, 1995 ; Peters et Conrad, 1996 ; Chidthaisong et Conrad, 2000).

Tableau 01 : Biotransformation des microorganismes du sol (Prescott *et al.*, 2003).

Processus	Réactions
Microorganismes aérobies	
Respiration aérobie	$(\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2 \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
Nitritation	$\text{NH}_4^+ + 3/2 (\text{O}_2) \longrightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$
Nitratation	
Microorganismes anaérobies facultatifs	
Réduction catabolique des nitrates	$\text{C}_{\text{organique}} + \text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{CO}_2$
Dénitrification	$\text{C}_{\text{organique}} + \text{NO}_3^- \longrightarrow \text{N}_2\text{O}, \text{N}_2 + \text{CO}_2$
Réduction du fer, Manganèse	$\text{C}_{\text{organique}} + \text{Fe}_3^+, \text{Mn}_4^+ \longrightarrow \text{Fe}_2^+, \text{Mn}_2^+ + \text{CO}_2$
Fermentation	$\text{C}_{\text{organique}} \longrightarrow \text{acides organiques (acétate, butyrate)}$
Microorganismes anaérobies strictes	
Réduction des sulfates	$\text{C}_{\text{organique}} (\text{ou } \text{H}_2) + \text{SO}_4^{2-} \longrightarrow \text{S}^{2-} (\text{ou } \text{H}_2\text{S}) + \text{CO}_2$
Réduction du CO_2	$\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+$
Déméthylation	$\text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_4$
Réduction du proton	$\text{Acide gras, alcools} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+$

I.2. Organisation spatiale de la communauté microbienne et biofilms

L'organisation spatiale de la communauté microbienne au sein d'un écosystème est influencée par deux grands groupes d'effets, les effets dits primaires et secondaires. Les effets primaires sont observés à courts termes, parmi ces effets nous pouvons citer la présence de ressources qui peuvent engendrer des modifications au niveau de la croissance, des activités enzymatiques, ou même de l'intégrité physique de cellules. Les effets secondaires sont observés à une plus grande échelle des écosystèmes, parmi ces facteurs nous pouvons citer l'hydrologie et l'occupation des sols. Au sein des effets primaires, il existe deux familles de facteurs qui influencent la structuration et l'organisation spatiale des communautés microbienne, les facteurs abiotiques et biotiques. Les facteurs abiotiques regroupent les conditions environnementales, la lumière, le pH, la température, le type de substrats, les conditions hydrodynamiques, etc. Les facteurs biotiques regroupent les interactions intrinsèques, comme la prédation, la compétition, l'allélopathie,.... etc. Suivant leurs natures et s'ils peuvent être sources ou non de perturbations, ils peuvent engendrer soit une phase d'accélération en favorisant la croissance (lumière, nutriments), soit une perte de biomasse (broutage, lyse) (Lock *et al.*, 1984).

I.2.1. Définition des biofilms

Les biofilms sont des associations denses et structurées de microorganismes entourées d'une matrice extracellulaire, qui se développent sur des surfaces telles que des tissus vivants, des appareils médicaux et agro-industriels, des systèmes de distribution d'eau et dans les écosystèmes naturels aquatiques. Ces organisations microbiennes permettent aux bactéries de se maintenir dans une niche écologique et de résister à de nombreux stress environnementaux tel que le pH, l'oxygène, la dessiccation et les composés bactéricides, grâce à la combinaison de différents mécanismes (**Donlan, 2002**).

Les premiers biofilms sont découverts en 1683 dans un échantillon de grattage d'une surface dentaire, **Zobell (1943)** a observé que les bactéries colonisent préférentiellement les parois des flacons. **Jones et al. (1973)** a détecté l'existence d'une matrice polyosidique autour des agrégats microbiens dans les filtres des stations d'épuration. **Characklis (1973)** a démontré la ténacité et la résistance des dépôts microbiens dans les conduites d'eau industrielles. Et depuis de nombreuses études ont été effectuées pour comprendre ces systèmes vivants, cependant il y a encore un manque de connaissances général sur la façon dont les biofilms se développent, changent et se détachent (**Wagner et al., 2010**).

I.2.2. Composition de la matrice extracellulaire

La composition et les propriétés physiques de la matrice extracellulaire entourant les cellules varient en fonction des espèces et des facteurs environnementaux, de manière générale elle est fortement hydratée et composée de substances polymériques (Extracellular Polymeric Substances, EPSs), à savoir des polysaccharides (40-95 % de son poids sec), des protéines (1 - 60 %), des acides nucléiques (1 - 10 %) et des lipides (1 - 40%) (**Flemming et Wingender, 2010**).

I.2.2.1. Polysaccharides

Les polysaccharides extracellulaires assurent le maintien et la cohésion du biofilm, ils sont classés en deux catégories en fonction de leur liaison aux cellules : les polysaccharides capsulaires fortement liées à la paroi bactérienne et les exopolysaccharides libérés dans le milieu extérieur (**Branda et al., 2005**). Leur biosynthèse est réalisée en deux étapes à partir de groupement uridine diphosphate-sucre. Des glycosyl transférases transfèrent ces groupements sur des lipides. Ceux-ci permettent leur transport hors de la cellule où a lieu la polymérisation.

Les polysaccharides retrouvées le plus fréquemment dans les biofilms sont les celluloses (pour les bactéries à Gram négatives comme *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*), l'acide colanique (pour certaines entérobactéries), le poly-N-acetylglucosamine (pour *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis*) et de l'alginate et de polysaccharides riches en mannose et galactose ou glucose (Ryder *et al.*, 2007).

I.2.2.2. Protéines

Les protéines retrouvées dans la matrice extracellulaire jouent un rôle structural et assurent en partie la communication entre les cellules au sein du biofilm. Les curli, structures protéiques adhésives de surfaces permettant par exemple l'agrégation de cellules d'*Escherichia coli*. Les pili synthétisés pour assurer le transfert de plasmides conjugatifs sont eux essentiels au développement du biofilm, car ils favorisent les contacts cellulaires et induisent ainsi la formation d'acide colanique et de curli (Pollock *et al.*, 1998).

I.2.2.3. Acides nucléiques

Les acides nucléiques sont retrouvés dans la matrice extracellulaire suite à la lyse de cellule ou par l'intermédiaire de vésicules membranaires (Whitchurch *et al.*, 2002). Ils jouent un rôle fondamental dans l'architecture et la stabilité du biofilm en favorisant les interaction acide-base entre les différents composants de la matrice et les cellules (Das *et al.*, 2010). L'ADN extracellulaire est aussi impliqué dans le processus d'adhésion chez certaines souches bactériennes comme *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Harmsen *et al.*, 2010).

I.2.2.4. Autres molécules

La matrice d'un biofilm peut contenir des proportions variables de lipide et phospholipide, elles présentent une activité protéolytique et elles sont capables d'interagir avec les composés bactéricides, participant ainsi à la résistance du biofilm aux stress environnementaux (Schooling et Beveridge, 2006). Ces vésicules assurent aussi le transfert d'ADN extracellulaire au sein du biofilm (Schooling *et al.*, 2009).

I.2.3. Organisation et rôle de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire assure la cohésion de la communauté bactérienne et permet la mise en place d'une architecture complexe, l'architecture et la composition d'un biofilm varient

en fonction des espèces et des conditions environnementales. De manière générale, le biofilm est composé d'agrégats de cellules, des microcolonies, englués dans une matrice d'EPSs et séparés les uns des autres par des canaux d'eau permettant entre autres la diffusion de nutriments et de molécules signal (**Donlan, 2002**). Un biofilm peut être composé d'une monocouche de cellules ou au contraire constituer d'une structure tridimensionnelle très élaborée. L'architecture d'un biofilm dans l'espace fluctue dans le temps en fonction de facteurs internes et externes (**Tolker-Nielsen et Molin, 2000**). Dans l'environnement, les biofilms sont généralement constitués de plusieurs espèces bactériennes, l'organisation tridimensionnelle de ces communautés permet le maintien des interactions entre microorganismes au cours du temps, ce qui leur confère un avantage écologique (**Flemming et Wingender, 2010**).

I.2.4. Structure de résistance

Les cellules vivantes en biofilm peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux composés bactéricides que les cellules planctoniques, ce qui indique un mécanisme de résistance différents entre les deux modes de vie, la résistance aux stress environnementaux est un processus multifactoriel (**Drenkard, 2003**), plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer ce phénomène tels que :

I.2.4.1. Limitation de la diffusion

La matrice extracellulaire exerce un rôle protecteur pour les cellules du biofilm en limitant la diffusion des composés toxiques (**Stewart, 1998**). En effet, elle est composée d'acide nucléique, de protéines et de sucres, elle présente des groupements fonctionnels chargés à savoir carboxyllates ($R-COO^-$), phosphates ($R-HPO_4^-$), sulfhydriles ($R-SH$), amines ($R-NH_3^+$), phénolique ($R-C_6H_4OH$) et hydroxyles ($R-OH$) (**Harrison et al., 2007**). En fonction de leur nature chimique, la diffusion des composés toxiques est affectée différemment, la pénétration des antibiotiques polycationiques (aminoglycosides) est fortement ralentie dans un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, alors que les fluoroquinolones chargées négativement, diffusent librement. De la même manière, la diffusion des ions métalliques est fortement ralentie, car ces derniers sont séquestrés dans la matrice (**Diels et al., 2009**), les groupements fonctionnels de cette dernière peuvent aussi directement réagir avec les composés toxiques et les modifier. D'autre part, de nombreux produits métaboliques et enzymes sont présents dans la matrice extracellulaire et peuvent réagir avec les composés toxiques. Les sulfites produits dans les

biofilms par les organismes sulfato-réducteurs, coprécipitent par exemple avec les métaux lourds. Les métaux coprécipitent aussi avec les carbonates (HCO_3^- et CO_3^{2-}) produits durant la respiration microbienne. Cependant, la matrice extracellulaire ne fait que limiter la pénétration des composés toxiques et lors d'une exposition longue à un composé bactéricide, lorsque tous les sites de fixation de la matrice sont saturés, ce mécanisme de défense est insuffisant et d'autres mécanismes prennent le relai (**Marchal, 2010**).

I.2.4.2. Phénotype spécifique du biofilm régulé par quorum-sensing

Le développement d'un biofilm est associé à des changements physiologiques de l'ensemble des cellules, ces changements physiologiques pourraient expliquer une partie de la forte résistance aux composés antibactériens d'un biofilm. Les adaptations physiologiques apparaissent après l'attachement des cellules à la surface et durant toute la croissance du biofilm et concernent la production d'exopolysaccharides, la morphologie des cellules et la synthèse des organelles de surfaces (**Stewart et Franklin, 2008**). Jusqu'à 50 % du contenu protéique varient entre des cellules d'un biofilm mature et des cellules planctoniques. Les cellules d'un biofilm synthétisent de manière accrue les protéines impliquées dans la résistance au stress oxydatif, la production d'exopolysaccharides et le métabolisme carboné. En raison de la faible diffusion des composés toxiques dans le biofilm, il a été proposé que les cellules y résident auraient plus de temps pour mettre en place les différents mécanismes de réponse au stress que les cellules vivant à l'état planctonique. Les gènes de la réponse au stress sont induits dans les cellules d'un biofilm, l'activation de ce mécanisme en phases stationnaire résulte en une augmentation de la résistance aux contraintes environnementales telles que les carences en nutriments, les dommages à l'ADN et le stress osmotiques et thermiques. Chez *P. aeruginosa*, le facteur RpoS qui est un régulateur principal de la réponse générale du stress, est surexprimé d'un facteur 3 dans les cellules d'un biofilm par rapport à une culture planctonique en phase stationnaire. Chez *E.coli*, l'induction de ce facteur résulte en une surproduction de tréhalose qui a un rôle d'osmoprotecteur et une surexpression de la catalase (**Liu et al., 2000**). Ce phénotype spécifique est au moins en partie induit par le système de *quorum sensing*. Ce système contrôle entre autres l'expression du facteur RpoS (**Drenkard, 2003**).

I.2.4.3. Hétérogénéité phénotypique

L'hétérogénéité phénotypique d'une population bactérienne est cruciale pour sa survie sous des pressions de sélection fluctuantes, cette diversité non liée à des modifications génétiques, permet à une fraction de la population de résister à un stress éradiquant le reste des individus et de recoloniser le milieu après levée de la pression. La résistance au stress, transitoire, car non transmise aux générations suivantes, est considérée comme une tolérance phénotypique (**Dhar et McKinney, 2007**). L'hétérogénéité phénotypique existe dans toutes les populations bactériennes, mais également masquée par les approches classiques de culture. L'organisation spatiale et les variations de la densité cellulaire entraînent la mise en place de gradients chimiques en nutriments, oxygène, déchets métaboliques ou encore facteurs de signalisation. Conduisant à la formation de microenvironnements. Ceux-ci favorisent l'augmentation de la diversité physiologique de la population. Cette hétérogénéité peut être spatialement organisée en sous-population de cellules présentant des activités métaboliques différentes en fonction des gradients chimiques. Elle peut aussi être aléatoirement répartie dans le biofilm, car liée au caractère stochastique des réactions chimiques cellulaires, et en particulier de l'expression des gènes (**Wimpenny *et al.*, 2000**).

I.2.4.4. Hétérogénéité génétique

Durant le développement d'un biofilm, des cellules mutantes (variantes) peuvent émerger, elles se caractérisent par la morphologie des colonies qu'elles forment sur milieu solide, leur phénotype est stable après plusieurs repiquage. Les variations sont liées à des délétions, mutations ou des polymorphismes d'un nucléotide simple dans divers gènes, le plus souvent codant la synthèse de polysaccharides, aussi de mobilité ou de résistance au stress (**Boles *et al.*, 2004**). L'apparition de cellules mutantes est expliquée par deux mécanismes, le premier est l'augmentation des échanges géniques entre les cellules du biofilm liée à l'importante densité cellulaire par conjugaison ou par l'action des phages. Le deuxième mécanisme fait intervenir les systèmes de réparation de l'ADN. En effet, il a été observé chez *P.aeruginosa* que les dommages à l'ADN causés par le stress oxydatif endogène lié à l'activité respiratoire sont éliminés par le système de réparation des cassures d'ADN double brin. Ce mécanisme de réparation a des conséquences mutagènes (**Ponder *et al.*, 2005**) et son inactivation empêche l'apparition de variants (**Boles et Singh, 2008**). Par ailleurs, les biofilm de *P.aeruginosa* comprennent souvent des cellules hyper-mutantes. Ces cellules sont affectées au niveau de leur système de réparation des mésappariements de l'ADN « Mismatch repair

system », la présence de ces mutants conféré une multirésistance aux antibiotiques. De plus, l'action de ces mécanismes de mutation combinée aux multiples pressions de sélection qui s'exercent dans un biofilm entraîne une augmentation rapide de la diversité. Les biofilms représentent ainsi des points chauds de création de diversité (Macia *et al.*, 2005 ; Stéwart et Franklin, 2008).

I.2.5. Cinétique du développement des biofilms

La formation d'un biofilm bactérien peut être découpée en trois étapes (Figure 02). L'initiation correspond à l'adhésion des cellules sur la surface, la maturation c'est développement de structures complexes organisées spatialement et le détachement soit des cellules individuelles, soit des portions entières de la communauté.

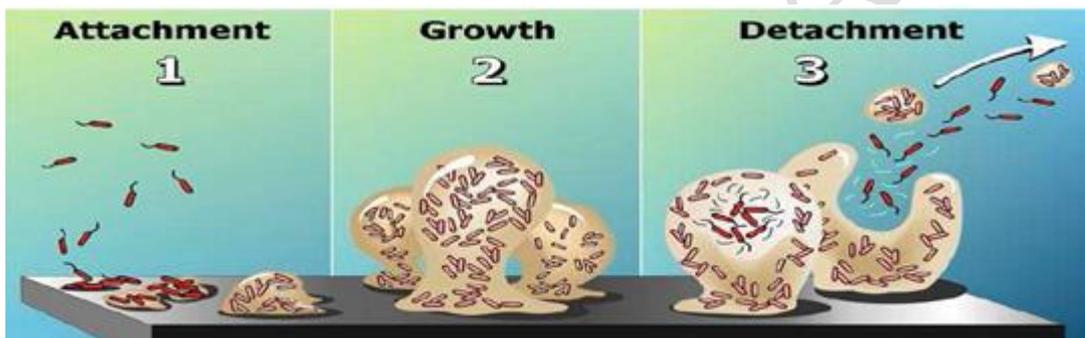


Figure 02 : Etape du développement d'un biofilm bactérien (Stoodley *et al.*, 2002).

I.2.5.1. Initiation d'un biofilm

L'étape d'initiation du biofilm nécessite le passage de la cellule d'un état planctonique à un état sessile et va s'effectuer en réponse aux facteurs environnementaux. La régulation de la mobilité joue un rôle principal dans cette transition. L'adhésion à un support implique quant à elle les structures et propriétés de la surface cellulaire (O'Toole *et al.*, 2000).

a) Transition entre les états planctoniques et sessiles

- **Rôle de la mobilité flagellaire et du chimiotactisme dans l'initiation du biofilm :** La mobilité d'une cellule lui permet de coloniser des milieux en fonction des conditions environnementales (Harshey, 2003), les procaryotes ont développé différents moyens de se déplacer faisant intervenir entre autres les flagelles. La mobilité flagellaire joue par ailleurs un

rôle essentielle dans l'initiation de la plupart des biofilms (**Verstraeten et al., 2008**) permettant entre autres de surmonter les forces de répulsion existant entre la cellule et la surface à coloniser (**Lemon et al., 2007**). La mobilité flagellaire peut aussi contribuer à l'adhésion cellulaire en augmentant la probabilité de contact entre la cellule et la surface (**O'Neil et Marquis, 2006**). La mobilité flagellaire est le mode de locomotion le plus fréquent et est utilisé par de nombreux organismes bactériens pour nager « swimming » en milieu liquides et pour se déplacer sur les surfaces solides « swarming ». Les bactéries mobiles sont capables de ressentir les variations de concentration des composés chimiques de leur environnement et d'y répondre. Le chimiotactisme est l'ensemble des mouvements flagellaires d'une cellule dépendants d'un gradient de concentration d'une molécule donnée. Cette concentration, détectée au niveau de récepteur chimiotactiques va jouer sur le sens de rotation du moteur du flagelle. Une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre entraîne une nage continue, alors qu'une rotation dans le sens de aiguilles d'une montre est associée à un mouvement irrégulier entraînant un déplacement net très faible (**Marchal, 2010**).

- **Rôle du monophosphate cyclique di-guanilique (c-di-GMP) :** La production de flagelles et la synthèse d'exopolysaccharides étant des procédés mutuellement exclusifs, la transition entre les états planctonique et sessile nécessite des changements physiologiques (**Kolter et Greenberg, 2006**). Le monophosphate cyclique di-guanilique (c-di-GMP) est un messager intracellulaire qui joue un rôle clé dans cette transition. En effet, il fonctionne comme un messager secondaire en réponse à des signaux extracellulaire et régule les comportements multicellulaires, la mobilité et la virulence de nombreuses espèces bactériennes. En général, de fortes concentrations en c-di-GMP coïncident avec une augmentation d'adhésion liée à une induction de la synthèse des fimbriae et de la capsule et une réduction de la mobilité par diminution de la synthèse et de la rotation du flagelle (**Hengge, 2009**). Le taux de c-di-GMP est régulé par divers facteurs environnementaux, par chimiotactisme ou quorum-sensing (**Figure 03**).

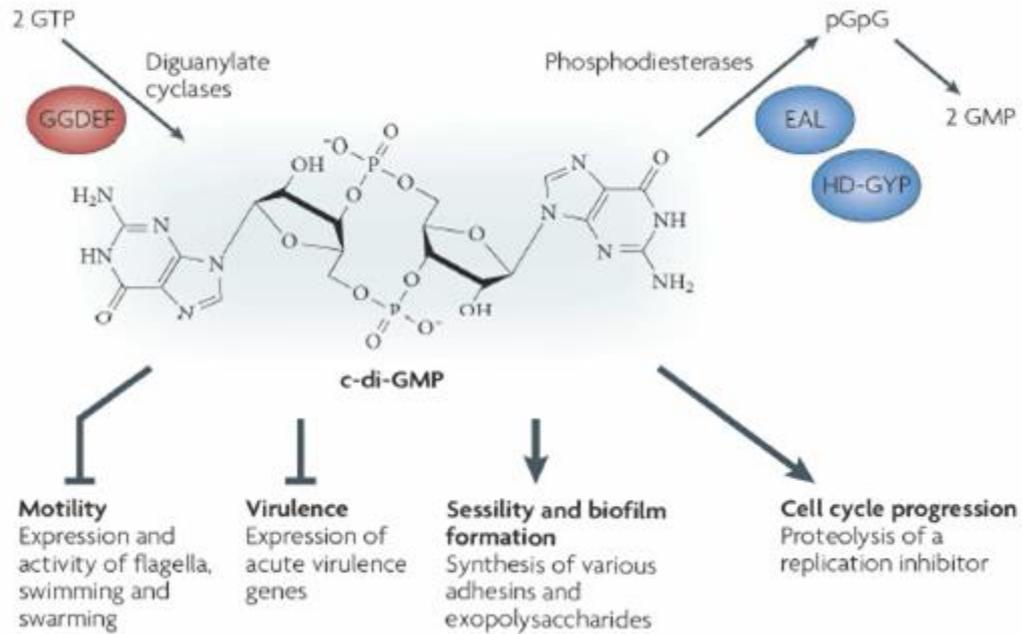


Figure 3 : Structure et rôle des différentes fonctions physiologiques du c-di-GMP (Hengge, 2009).

b) Adhésion à la surface

Une fois entamée, la transition de l'état planctonique à l'état sessile va nécessiter des modifications physiologiques importantes qui vont faciliter l'adhésion de la cellule à une surface. Ces modifications concernent la charge et les propriétés d'hydrophobicité de la surface cellulaire ainsi que la synthèse de protéines de la membrane externe (Goulter *et al.*, 2009).

- **Forces mises en jeu :** L'adhésion d'une cellule à une surface est divisée en une étape d'adhésion réversible et une irréversible. L'attachement réversible implique des forces faibles (liaison van der Waals, électrostatique, interaction hydrophobes) entre la cellule et la surface. A cette étape, les cellules sont facilement détachables par les forces hydrodynamiques du liquide environnant. L'étape d'adhésion irréversible met en jeu des forces plus importantes, telles que des liaisons hydrogènes, covalentes ou des interactions hydrophobes fortes. La perte des flagelles et la synthèse d'organelles d'adhésion telles que les fimbriae est souvent nécessaire pour la fixation irréversible à proprement parler. A ce stade, le décrochage des cellules nécessite des méthodes physiques ou chimiques plus drastiques (Goulter *et al.*, 2009).

- **Structure et propriétés impliquées dans l'adhésion :** L'attachement d'une cellule à un support est principalement fonction, outre de la nature du support même, de la charge et

des propriétés hydrophobes de sa surface ainsi que des structures protéiques qui s'y trouvent. Ces fonction d'adhésion sont régulées par les facteurs environnementaux grâce aux mécanismes de quorum-sensing et au chimiotactisme. La charge nette de la surface est généralement négative en raison des groupes carboxyles ($-\text{COO}^-$) et phosphates ($-\text{PO}_4^{2-}$) qui se trouvent dans les parois (**Wilson et al., 2001**). Les propriétés hydrophobes de la surface cellulaire liées à sa composition varient en fonction des espèces, du stade de croissance et des conditions de culture, l'hydrophobicité est généralement estimée sur une population de cellules en mesurant soit l'affinité de la culture pour un solvant (**Bellon-Fontaine et al., 1996**) soit l'angle de contact entre le tapis de cellules et un liquide (**Van der Mei et al., 1998**). Les polysaccharides de la capsules peuvent aussi jouer un rôle dans l'adhésion de la cellule soit en accroissant ses capacités adhésives s'ils sont hydrophobes, soit en les diminuant s'ils sont hydrophiles et masquent des composants hydrophobes de l'enveloppe cellulaire (**Goulter et al., 2009**). Les protéines de la membrane externe, protéines membranes ou lipoprotéines, des bactéries Gram négatives représentent environ 50 % en masse de la membrane externe. Leur synthèse et leur nature affectent directement les propriétés de la surface cellulaire. Les flagelles peuvent servir de structures adhésives, indépendamment de leur rotation (**Kirov et al., 2004**). Les fimbriae ou pili participent à l'hydrophobicité de la surface par leur forte proportion en acides aminés hydrophobes. Les pili de type IV sont des fimbriae particuliers retrouvés chez les bactéries Gram négatives et positives sont impliquées dans l'attachement des bactéries aux surfaces (**Pellicic, 2008**). Les curli sont également un type de fimbriae particulier produits par certaines entérobactéries dont *E.coli*. Leur synthèse est accrue en condition de stress, ce qui a pour conséquence d'augmenter les capacités d'adhésion de cellules (**Boyer et al., 2007**).

I.2.5.2. Formation et maturation des structures

a) Formation des microcolonies

Après leur attachement irréversible sur une surface, les cellules forment des zones de forte densité cellulaire, trois mécanismes permettant la mise en place de ces agrégats cellulaires ont été proposés. Le premier n'impliquant aucune forme de mobilité est la réplication clonale des cellules ayant adhéré irréversiblement à la surface (**Klausen et al., 2003**). Le deuxième mécanisme est basé sur le *twitching*, mouvement de translocation de surface lié aux pili. Il permet le déplacement des cellules le long de la surface et ainsi leur regroupement en microcolonies (**O'Toole et Kolter, 1998**). Le troisième mécanisme de formation de microcolonies est basé sur le recrutement de cellules planctoniques

au fur et à mesure du développement du biofilm. L'implication relative de ces trois mécanismes dépend de la nature de l'organisme, de la surface à coloniser et des conditions physicochimiques. Un modèle de formation de microcolonies a été proposé pour *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 4), les microcolonies sont initiées par réplique clonale, les structures sont ensuite élargies grâce au *twitching* qui permet à la souche de coloniser l'intégrité de la surface, la mobilité flagellaire assure ensuite le développement tridimensionnel des structures (Barken *et al.*, 2008 ; Klausen *et al.*, 2003).

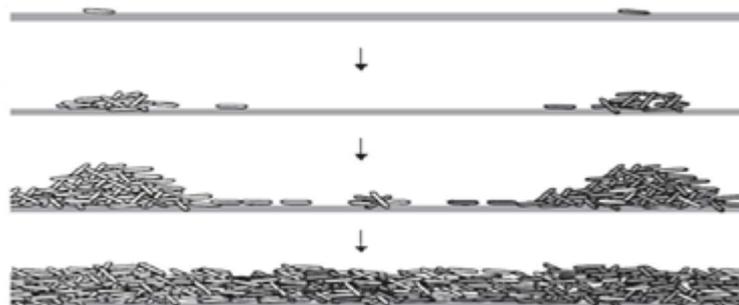


Figure 4 : Formation d'un biofilm microbien (Klausen *et al.*, 2003)

b) Différenciation du biofilm et interactions entre les cellules

La morphologie des biofilms matures est très variable, allant de la simple couche de cellules à des architectures extrêmes complexes, lors de la mise en place des structures tridimensionnelles, les cellules subissent des différenciations physiologiques notamment au niveau de leur activité de synthèse des exopolymères qui sont régulées par le quorum-sensing. L'organisation tridimensionnelle des structures favorise ensuite la communication et la coopération entre les cellules (Marchal, 2010).

- **Caractérisation de la population d'un biofilm mature :** La régulation des gènes et le profil protéique diffèrent fortement entre des cellules d'un biofilm mature et celles d'une culture planctonique (Stoodley *et al.*, 2002). Tout d'abord, les gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides sont induits dans les cellules d'un biofilm, les exopolysaccharides assurant la cohésion et le maintien des structures. Par ailleurs, la biosynthèse des phospholipides et des lipopolysaccharides et le transport et la sécrétion membranaires sont accentués assurant la synthèse de la matrice extracellulaire. D'autre part, des variations dans l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique ont été observées.

Cela est lié au fait que beaucoup de cellules du biofilm modifient leurs processus physiologiques, passant par exemple d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie en réponse à la niche particulière qu'elles occupent au sein du biofilm (Stewart et Franklin, 2008). Enfin, des mécanismes d'adaptation et de défense, tels que la réponse générale au stress régulée par le facteur RpoS sont induits dans le biofilm mature (Sauer *et al.*, 2002).

- **Rôle du quorum-sensing :** Lors de la maturation des biofilm, des canaux d'eau sont mis en place, ceux-ci améliorent d'une part le transfert des nutriments mais facilitent aussi tous les phénomènes de quorum-sensing. Le quorum-sensing joue en effet un rôle capital dans la différenciation du biofilm et la coordination des activités de la communauté. Il intervient par exemple dans l'induction de la synthèse des exopolysaccharides. En effet, il a été démontré que lors du développement du biofilm de *P.aeruginosa* des acyl homosérines lactones induisent une surproduction d'exopolysaccharides (Sakuragi et Kolter, 2007).

- **Interaction entre les cellules :** La forte densité cellulaire d'un biofilm mature favorise les échanges géniques, par l'intermédiaire de phage (Kirov *et al.*, 2007) ou de plasmides (Sorensen *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'organisation structurale favorise la coopération entre les cellules. Ainsi, dans un biofilm multi-spécifique, l'arrangement des cellules facilite la juxtaposition d'organisme au métabolisme complémentaire. Dans un biofilm monospécifique, l'architecture complexe installe des gradients physicochimiques. Cette hétérogénéité de structure favorise le développement de sous-populations de cellules qui accroissent la diversité de la population (Stewart et Frankil, 2008). Toutefois, la forte densité cellulaire d'un biofilm entraîne également des situations de compétition entre les cellules pour les nutriments par exemple. Un biofilm est donc le résultat d'un équilibre entre collaboration et conflits (Nadell *et al.*, 2009).

c) Evènement de mort et lyse cellulaire localisés

Un biofilm mature est formé de sous population de cellules aux états physiologiques variables car soumises à différents conditions environnementale. Certaines vont par exemple produire plus d'exopolysaccharides et d'autres entrer en dormance voire mourir et lyser. Les événements de mort et lyse cellulaire localisées sont fréquemment observés au cours de l'étape de maturation d'un biofilm. Ils apportent des nutriments au reste de la population, mais aussi de l'ADN qui est un composant structurel essentiel du biofilm. Ces évènements participent ainsi au développement et à la dispersion du biofilm. La mort et la lyse des cellules sont deux événements indépendants plus au moins régulés en fonction des espèces bactériennes.

Ils peuvent être le résultat d'une réponse hétérogène d'un biofilm à un stress environnemental, contrôlés par des mécanismes de mort cellulaire programmée ou encore liés à des phénomènes de fratricide (Stewart et Frankil, 2008).

- **Mort et lyse cellulaire programmées** : Les phénomènes de mort et lyse cellulaire programmées se déroulant chez les eucaryotes les plus évolués ont pour rôle d'éliminer les cellules endommagées afin que celles-ci ne deviennent pas une menace pour le reste de la population (Bayles, 2007). Il a été proposé qu'un mécanisme similaire pouvait être à l'origine de l'élimination de certaines cellules bactériennes en réponse à des agents antibactériens. Les événements de mort et lyse engendrés touchant la population bactérienne au centre des microcolonies. Ce sont les zones de plus forte densité cellulaire du biofilm, et par conséquent ou le quorum sensing régulant en partie ces mécanismes et le plus important (Lewis, 2001).

- **Implication d'un bactériophage** : La mort et la lyse cellulaire au sein d'un biofilm peuvent aussi être la conséquence de l'activation d'un bactériophage. Les gènes des bactériophages exprimés en condition de stress sont parmi les groupes de gènes les plus induits dans les biofilms. Chez *P.aeruginosa*, les gènes codant pour le bactériophage filamenteux sont 83 fois plus transcrit dans les cellules d'un biofilm en réponse au quorum-sensing que dans une culture planctonique (Whiteley *et al.*, 2001). L'entrée du phage filamenteux en cycle lytique conduit à la mort et à la lyse des cellules situées au centre des microcolonies du biofilm. Ces événements influencent fortement le développement subséquent du biofilm, favorisent sa dispersion et augmentent la diversité génétique de la population dispersée (Rice *et al.*, 2007 ; Webb *et al.*, 2004).

- **Cannibalisme et fratricide** : La mort et la lyse d'une partie de la population d'un biofilm peuvent aussi résulter de phénomènes de cannibalisme ou de fratricide. De telles situations ont été observées dans des biofilms de *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis*.

Exemple 1 : Chez *Bacillus subtilis*, la surfactine une molécule signal du quorum-sensing induit la phosphorylation de la protéine régulatrice SpoOA. En fonction de son degré de phosphorylation, celle-ci induit une synthèse accrue d'exopolysaccharides accompagnée par la production de deux toxines (Skf et Sdp). Dans un biofilm, les cellules qui synthétisent les toxines provoquent la mort et la lyse de leurs congénères sensibles. L'augmentation en nutriments qui résulte de ces événements favorise les cellules productrices d'exopolysaccharides et donc le développement du biofilm. L'exposition d'un biofilm de *Bcillus subtilis* à des composés microbiens entraîne une réponse similaire de la population. Ce processus de mort cellulaire apparenté à du cannibalisme et modulant le développement du biofilm semble donc correspondre à un mécanisme de défense (Lopez *et al.*, 2009 ; Engelberg-Kulka *et al.*, 2006).

Exemple 2 : Un mécanisme de mort cellulaire apparenté à un phénomène de fratricide a été décrit chez *Enterococcus faecalis*. Une phéromone induit la co-synthèse d'une gélatinases, enzyme activant une protéine autolytique (AtIA) et d'une protéine d'immunité, une sérine protéase (SprE) qui empêche l'activation de la protéine autolytique. La réponse de la population du biofilm à phéromone est bimodale, la sous-population cellulaire qui ne répond pas à la phéromone est lysée suite à l'activation des protéines AltA par les gélatinases qui sont sécrétées par l'autre partie de la population. L'ADN libéré lors de la lyse des cellules permet le développement du biofilm (Thomas *et al.*, 2009).

I.2.5.3. Dispersion du biofilm

Lorsque le biofilm a atteint une certaine densité cellulaire, l'accumulation de déchets métaboliques toxiques et l'appauvrissement du milieu en nutriment rendent la dispersion du biofilm bénéfique. Ce phénomène permet ainsi aux cellules de migrer vers des environnements plus favorables. La dispersion d'un biofilm a été observée en réponse à des carences en carbone, azote ou oxygène (Gjermansen *et al.*, 2005), ainsi qu'à un épuisement en nutriments dans le milieu environnant (Hunt *et al.*, 2004). Chez des souches du genre *Pseudomonas*, il a été montré qu'une faible variation de la concentration en nutriments induit la dispersion du biofilm. La faible concentration en oxygène dans les couches les plus profondes d'un biofilm a aussi été associée avec une fréquence plus importante d'événements de dispersion chez *Shewanella oneidensis* (Thormann *et al.*, 2005 ; Karatan et Watnich, 2009).

a) Dégradation de la matrice extracellulaire

La libération d'enzyme extracellulaire dégradant la matrice du biofilm, par modification des protéines ou digestion des sucres et des acides nucléiques qui la composent est un des mécanismes conduisant à la dispersion des cellules.

- **Dégradation des protéines extracellulaire :** La libération de protéases dans le milieu extracellulaire conduit à la dégradation des appendices protéiques composant la matrice du biofilm (Lee *et al.*, 1996). Chez *P.putida*, une cysteine protéique (LapG) modifie LapA, une protéine de surface. Le clivage de LapA entraîne la libération des cellules piégées dans la matrice du biofilm. Chez *S.aureus*, des concentrations importantes en sérine protéase ont été retrouvées dans le surgéant de culture d'un biofilm en cours de dispersion. Cette enzyme ayant pour cible les protéines de surface, facilite la désagrégation du biofilm (Boles et Horswill, 2008). Prailleurs, il a récemment été décrit que l'ajout d'acide aminés sur certains biofilm, dont ceux

de *B.subtilis*, entraîne la dispersion des cellules. Cette dispersion est accompagnée par le déclenchement de fibres protéiques ancrées aux cellules et participant à la structure du biofilm. Le mécanisme d'action des acides aminés sur le déclenchement de ces fibres n'est pas encore élucidés (Kolodki-Gal *et al.*, 2010).

- **Dégradation des exopolysaccharides :** En réponse aux stimulate environnementaux, des enzymes libérées dans le milieu extérieur digèrent les sucres composant la matrice du biofilm et favorisent ainsi la dispersion de la population. Ainsi, chez *P.aeruginosa*, l'alginate libérée par les cellules dégrade l'alginate de la matrice. La libération d'enzymes dégradant les sucres peut être accompagnée d'une baisse de la production d'exopolysaccharides. Par ailleurs, la β -hexosamidase peut être utilisée pour disperser les biofilms pathogènes. En effet, cette enzyme digère le poly-N-acetylglucosamine présent dans les biofilms de bactéries à Gram négatives et positives (Karatan et Watnich, 2009).

- **Digestion de l'ADN extracellulaire :** L'ADN étant un composant essentiel des biofilms, un biofilm peut être artificiellement dispersé par ajout de DNase. Dans certains biofilms, tels que celui de *S.aureus*, une thermonucléase est libérée par les cellules pour favoriser leur dispersion (Mann *et al.*, 2009).

b) Changement des propriétés de membrane

La modification des propriétés de membrane d'une cellule peut conduire à son détachement du biofilm. La perte des pili de type IV ou la production de substances tensioactives, telles que les rhamnolipides, entraînent le détachement des cellules par modification de leur propriétés de surface (Karatan et Watnich, 2009). La présence de rhamnolipides dans un biofilm de *P.aeruginosa* conduit par exemple à la dispersion des cellules situées au centre des microcolonies (Boles *et al.*, 2005).

c) Remobilisation des cellules

La dispersion d'un biofilm peut être assurée par la réactivation de la mobilité flagellaire des bactéries, mobilité réprimée lors de l'initiation du biofilm (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005). Chez *E.coli*, une carence en carbone induit la synthèse de la protéine CsrA qui active à son tour l'opéron *flhDC*, opéron maître de synthèse du flagelle (Jackson *et al.*, 2002). Ces événements de remobilisation concernent souvent une sous-population de cellules localisée dans les cavités formées au centre des microcolonies lors des événements de mort et lyse cellulaire. Cette sous-

population accède au milieu extérieur via des points de passage dans le mur de cellules non mobiles qui l'entoure (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000).

I.2.6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

Les facteurs les plus importants contrôlant la formation d'un biofilm sont :

I.2.6.1. Paramètres hydrologiques

Les paramètres hydrologiques englobent de nombreux facteurs, on peut noter principalement la fréquence et l'intensité des crues, la vitesse du courant et la stabilité du lit du cours d'eau. Les crues, en réinitialisant la dynamique des communautés, créent de nouveaux cycles d'accumulation de biomasse et de succession d'espèces et peuvent ainsi contribuer à augmenter la diversité des communautés (Biggs et Close, 1989).

I.2.6.2. Température

La température de l'eau présente des variations journalières et saisonnières, outre son influence directe qui est d'augmenter les taux de production du biofilm dans le cas de températures élevées. Ainsi, la température du milieu a une forte incidence sur la sélection et le développement des différentes espèces présentes dans le cours d'eau. Pour chaque espèce, il existe une relation qui suit une courbe de Gauss (ou courbe en "cloche") entre son développement et la température du milieu, avec une température optimale de croissance et une température létale (Biggs, 1990).

I.2.6.3. Eclairage

La lumière est un paramètre structurant pour la fraction autotrophe du biofilm, ce paramètre, décrit par son intensité et sa composition spectrale, peut devenir limitant dans le cas des milieux aquatiques à fort ombrage ou présentant une importante turbidité, suite à une crue par exemple. Les végétaux aquatiques peuvent également gêner la pénétration de la lumière dans le cas d'un fort développement (Bishop, 1997).

I.2.6.4. Nature des supports de colonisation

L'adhésion des organismes benthiques dépend des caractéristiques des supports disponibles. Les substrats de colonisation peuvent être durs, comme les rochers et les plantes

aquatiques, ou meubles comme la vase. Les caractéristiques des substrats qui peuvent influencer le développement des biofilms sont (**Garry *et al.*, 1995**) :

- **Structure du substrat** : une structure ouverte, c'est-à-dire permettant à l'eau et aux organismes de circuler facilement, favorise l'accrochage et le développement des organismes ;
- **Stabilité du substrat** : un substrat stable est plus hospitalier pour le développement des organismes ;
- **Rugosité du support** : un support lisse désavantage l'accrochage des organismes constitutifs du biofilm. Cependant, le nombre de cellules adhérentes n'augmente pas systématiquement avec la rugosité moyenne de la surface, car il faut également prendre en compte la taille et la morphologie des cellules.

I.2.6.5. Facteurs biologiques

Le périphyton est à la base de la chaîne trophique et sert d'aliment principalement aux macroinvertébrés qui seront ensuite, eux-mêmes consommés par les poissons et les oiseaux. L'action de prélèvement des biomasses végétale et microbienne par les animaux pour leur nourriture est nommée "brouillage". Cette action de brouillage explique souvent la plus grande partie des pertes de biofilm, mais n'apportent qu'une contribution minimale durant les périodes où la température est plus faible et où les brouilleurs sont moins nombreux (**Dukan *et al.*, 1995**).

I.2.6.6. Effets des nutriments

Les facteurs chimiques déterminants de la croissance du périphyton peuvent être différents au sein de chaque biotope : phosphore, azote, carbone, éléments traces, combinaison des facteurs (**Peterson *et al.*, 1983**). Cependant le phosphore et azote sont reconnus être les paramètres principaux. En outre, **Borchardt (1996)** souligne que lorsque la lumière n'est pas limitante, ce sont les nutriments qui constituent la ressource la plus déterminante pour le développement des biofilms. Les enrichissements en nutriments stimulent la croissance du périphyton (**Dodds *et al.*, 2002**). Au niveau de la composition interne du périphyton dans les situations oligotrophes, un apport en nutriments se traduit par une augmentation de la biodiversité. En cas de situations eutrophes à hypereutrophes, il y a spécialisation et réduction de la richesse spécifique. Un apport en continu d'éléments nutritifs et notamment de phosphore, peut inhiber le développement de certaines espèces et réduire ainsi la biodiversité. En ce qui concerne la

quantité de biofilm, l'entrée d'éléments nutritifs dans le milieu a généralement pour conséquence une augmentation des biomasses périphytiques (**Benmoussa, 1995**).

I.3. Etat viable non cultivables

L'état dit Viable mais Non Cultivable (VNC) a été proposé pour la première fois en 1982, par le laboratoire de Rita Colwell de l'université du Maryland. Cette équipe montra que des cellules de *Escherichia coli* et de *Vibrio cholerae* étaient toujours vivantes bien qu'incapables de se multiplier sur un milieu gélosé (**Xu, et al., 1982**). Il a été décrit que pour être considérée comme viables, des cellules devaient conserver une intégrité membranaire, une activité enzymatique, et la capacité à avoir une activité métabolique. En général, les cellules viables sont capables de former des colonies sur milieux gélosés, et lorsqu'elles perdent cette capacité, elles sont alors usuellement considérées comme mortes. Cet état métabolique particulier dit VNC décrit des cellules toujours actives métaboliquement, mais dans l'incapacité de se multiplier, notamment sur les milieux gélosés qui permettent leur quantification habituellement. Cet état métabolique a été proposé comme une stratégie des cellules pour résister aux conditions environnementales difficiles, notamment pour les bactéries ne formant pas de spores, qui n'ont pas de système de survie assuré par les endospores. Il est important de noter que pour dire d'une cellule qu'elle est en état VNC, il faut que celle-ci soit capable de redevenir cultivable si les conditions environnementales s'améliorent : il s'agit de la « ressuscitation » ou réanimation (**Oliver, 1993**).

I.3.1. Bactérie viable non cultivable

Les bactéries à l'état VBNC sont incapables de les cultiver sur les milieux de culture conventionnels mais possèdent néanmoins une activité métabolique. Cet état est complexe et sa définition très controversée. En effet, cette définition s'applique à deux états physiologiques différents et peut correspondre à des bactéries (**Yamamoto, 2000**) :

- Potentiellement répliquatives c'est-à-dire pouvant retrouver leur capacité à cultiver si des conditions spécifiques sont rencontrées ; ce qui conduit à la ressuscitation ou le réveil des cellules. Ce réveil est la démonstration de l'existence d'un l'état VBNC chez l'espèce bactérienne considérée. Dans ce cas, l'état VBNC constituerait donc une stratégie de survie vis-à-vis des conditions défavorables de l'environnement (**Colwell, 2000**).

- En phase de transition, de la vie vers la mort cellulaire, dans laquelle ces bactéries possèdent encore des signes d'activité métabolique et de respiration mais se dégradent progressivement (**Yamamoto, 2000**).

Des transformations cellulaires telles que la réduction de la taille des cellules, la diminution de la quantité d'ARN, la condensation du cytoplasme, l'incapacité à se multiplier ou encore la réduction de l'activité métabolique caractériseraient cet état VNC (**Tangwatcharin *et al.*, 2006**). Cet état survient majoritairement dans la phase de survie, après la phase stationnaire. Plus de 60 espèces bactériennes sont décrites comme étant capables d'entrer à l'état VNC, incluant de nombreux pathogènes humains, Gram positifs (*Listeria monocytogenes*, *Enterococcus*, *Micrococcus luteus*, ...) et Gram négatifs (*E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas*, *Helicobacter pylori*, ...) (**Tableau 02**). Cet état intervient lorsque ces microorganismes sont exposés à différents stress comme la diminution de la quantité de nutriments disponibles, la température, la salinité, la teneur en oxygène (**Gauthier, 2000**).

Tableau 02 : Condition de formation et de réveil de l'état VNC chez différents bactéries (**Kell *et al.*, 1998**).

Micro-organismes	Condition de formation VBNC	Resuscitation
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Conservation dans l'eau de rivière stérile à 15 °C	Utilisation d'un milieu riche.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Absence d'éléments nutritifs après la phase stationnaire durant 4 – 6 semaines.	Resuscitation de certaines souches après leur injection dans des souris
<i>Escherichia coli</i>	Absence d'éléments nutritifs par conservation dans de l'eau autoclavée.	Resuscitation après leur injection dans des lapins.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Absence d'éléments nutritifs par conservation dans du tampon phosphate.	-
<i>Legionella pneumophila</i>	Absence d'éléments nutritifs par conservation dans de l'eau distillée à 30 °C.	Resuscitation après une co-culture avec <i>Tetrahymena pyriformis</i> (protozoaire unicellulaire).
<i>Micrococcus luteus</i>	Conservation de la souche bactérienne à la phase stationnaire à température ambiante	Resuscitation par culture dans un surnageant de culture actives.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence d'éléments nutritifs après la phase stationnaire.	Resuscitation par une filtration dans des conditions d'anaérobiose.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Conservation dans un milieu minimum à 25 °C.	Utilisation d'un milieu dépourvu de Carbone.
<i>Salmonella enteritidis</i>	Absence d'éléments nutritifs par conservation dans une solution saline à 21 °C.	Utilisation d'un bouillon de lactose.
<i>Vibrio cholerae</i>	Absence d'éléments nutritifs par conservation dans une solution saline à 15 °C.	Utilisation d'un court choc thermique.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Conservation dans un milieu minimum à 3,5 °C.	Utilisation d'un milieu riche.
<i>Yersinia ruckeri</i>	Conservation dans de l'eau de rivière stérile à 6 ou 18 °C.	Utilisation d'un milieu riche.
-	: Absence d'information	

I.3.3. Facteurs influençant l'état VNC

I.3.3.1. Carence en nutriments

L'état VBNC a été décrit pour la première fois chez différentes souches de *Legionella pneumophila* serogroupe 1 en 1987, suite à la découverte dans des échantillons provenant du Stafford District General Hospital très peu de temps après une épidémie de légionellose, de légionelles non détectées sur milieu gélosé mais détectées grâce à une méthode de comptage direct utilisant des anticorps fluorescents (DFA) (Hussong *et al.*, 1987). Cette équipe a supposé que ces bactéries, à l'image de ce qui avait été découvert chez *Vibrio cholerae* en 1985, devaient être à l'état viable non cultivable. Par conséquent, ils ont étudié la croissance et la survie de deux souches de *L. pneumophila* (dans de l'eau du robinet à 4 °C et / ou 37 °C. Il s'est avéré que ces bactéries devenaient non cultivables après 74 et 40 jours à 4°C et 37°C respectivement mais étaient toujours fortement détectées par les anticorps fluorescents et semblaient toujours viables. Des tests d'infection d'oeufs embryonnaires de poulet ont montré que ces bactéries étaient capables de retrouver leur capacité à cultiver sur milieu gélosé mais que la virulence de ces bactéries à l'état VNC était cependant réduite envers ces oeufs embryonnaires par rapport aux cellules cultivables (Colwell *et al.*, 1985). Dix ans plus tard, Steinert *et al.* (1997), en réalisant une expérience, il a montré que des légionelles incubées dans de l'eau du robinet stérile à 25°C pendant 125 jours perdaient la capacité à former des colonies sur milieu gélosé ; mais possédaient encore une activité métabolique. Ces mêmes cellules cocultivées à 37 °C avec *Acanthamoeba castellanii*, protozoaire largement répandu dans l'environnement, ont retrouvé leur capacité à cultiver sur milieu gélosé après 24 heures d'incubation.

I.3.3.2. Influence de la température

La température de l'eau est sans doute un des paramètres les plus importants gouvernant la présence des bactéries puisqu'elle influence à la fois sa multiplication et sa survie. En effet, il est admis que cette bactérie se multiplie dans le milieu hydrique à des températures comprises entre 25 °C et 42 °C et qu'elle a la capacité d'y survivre entre 6 et 66 °C. Lorsque la température atteint des valeurs supérieures à 40 °C, la quantité de bactéries cultivables diminue de façon importante en fonction du temps d'incubation bien qu'une activité métabolique soit maintenue (Ohno *et al.*, 2003).

I.3.3.3. Influence de la teneur en oxygène dissous

Les légionelles sont des bactéries aérobies ; elles exigent pour leur croissance la présence d'oxygène à une teneur supérieure à 2,2 mg/l. *Legionella pneumophila* ne se multiplie que dans des conditions aérobies (6,0 à 6,7 mg/l d'oxygène dissous). Dans ces conditions, la population bactérienne augmente de 1 log après 7 jours d'incubation à 35°C. Par contre, pour des teneurs moins élevées en oxygène (1,7 à 2,2 mg/l d'oxygène dissous), aucune multiplication n'a pu être observée ; au contraire, à partir de 7 jours d'incubation à 35°C à ces teneurs, la population bactérienne diminue de 0,5 log, puis de 1,7 log au bout de 28 jours (Wadowsky *et al.*, 1985).

I.3.3.4. Influence du pH

La croissance des bactéries dans l'eau potable, a été observée à des pH compris entre 5,5 et 9,2 avec un optimal à pH 6,9 (Wadowsky *et al.*, 1985). Les travaux menés par Ohno *et al.* (2003) ont montré qu'il existait une relation entre la température et le pH pour la survie de cette bactérie : plus le pH s'éloigne de la neutralité et moins la survie est importante, et pour un pH donné, la survie baisse quand la température s'élève. Par exemple, à pH 10,0 à 42°C, les légionelles perdent rapidement à la fois leur cultivabilité et leur activité métabolique alors qu'à pH 5,0 à la même température, la cultivabilité est perdue mais l'activité métabolique est maintenue pendant au moins 61 jours (les bactéries sont dans un état VNC). A pH 6,0 et 8,0, à la même température, la cultivabilité est lentement perdue.

I.3.3.5. Influence de la salinité

Des travaux portant sur l'effet conjugué de la salinité et de la température sur la croissance ont montré que pour des températures comprises entre 4 et 20 °C, les variations de concentration de sels ont peu d'influence sur la croissance bactérienne. Exemple : sur cette gamme de température, *Legionella* peut survivre dans des solutions allant jusqu'à 3 % de salinité. Par contre, pour des températures plus élevées, une corrélation a été observée entre l'augmentation de la concentration en NaCl et la réduction du nombre de cellules. Aussi pour des températures de 30 °C et 37 °C, les fortes concentrations en sels (supérieures à 1,5%) provoquent une forte diminution du nombre de cellules (Heller *et al.*, 1998).

I.3.3.6. Traitements oxydants

De nombreuses études ont été menées sur l'impact des traitements (chlore, chaleur, ozone, UV, monochloramine). La plupart d'entre elles, basées simplement sur des analyses de cultivabilité, montre une action efficace des traitements sur la réduction et l'inactivation des bactéries (**Cunliffe, 1990**). Cependant, en utilisant un marqueur de viabilité en complément des méthodes de culture sur milieu gélosé, ont montré que des traitements au chlore utilisés pour désinfecter des tours aéroréfrigérantes étaient capables d'induire la production de bactéries viables non cultivables. Récemment, **García, et al. (2007)**, ont mené une étude sur sept souches de *L. pneumophila* cliniques et environnementales traitées par 256 mg/L d'hypochlorite de sodium. Cette étude a montré que des souches qui n'étaient plus cultivables après le traitement par l'hypochlorite de sodium étaient capables de retrouver leur capacité à se multiplier après avoir été mis en présence d'*Acanthamoeba polyphaga* (protozoaire). Ce qui confirme la présence de VBNC après traitement avec l'hypochlorite de sodium.

I.3.4. Modifications physiologiques et morphologiques

Les cellules en VNC diffèrent des cellules cultivables par de nombreuses caractéristiques cellulaires : taille, structure de la membrane, synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines et d'ATP. En effet, pour mieux comprendre les changements engendrés au sein d'une cellule par l'entrée en état VNC (**Beumer et al., 1992**), de nombreuses études sur les bactéries ont été menées et elles peuvent être résumées comme suit :

En ce qui concerne le dispositif énergétique de la cellule, il a été montré un maintien de la synthèse d'ATP, d'un point de vue morphologique, les cellules en état VNC sont pour la plupart de taille inférieure à des cellules cultivables. Chez *V. cincinnatiensis* par exemple, les cellules en état normal sont souvent sous forme de spirale d'environ 1,8 µm de long, alors que les cellules en état VNC évoluent graduellement vers une forme coccoïde, avec un rayon moyen de 0,2 µm. Chez *V. vulnificus*, les cellules cultivables font 2 µm de longueur et seulement 0,6 µm de diamètre en état VNC (**Lindbäck et al., 2010**).

En ce qui concerne la structure de la surface cellulaire, des modifications de composition ont été observées, notamment chez *V. vulnificus* au niveau de la composition en acides gras, ce qui suggère une capacité à modifier la fluidité membranaire lors d'un passage en état VNC. Des modifications protéiques de la composition de la surface cellulaire ont aussi été observées chez

Helicobacter pylori et une modification du peptidoglycane d'*E.coli* lors de l'état VNC a également été mise en évidence (Day et Oliver, 2004).

En ce qui concerne les protéines cellulaires, il a été montré que la synthèse protéique ne s'arrêtait pas au cours de l'état VNC, et même que la production de certaines protéines absentes en état normal de croissance pouvait apparaître. Toutefois, aucune protéine n'a pu être mise en évidence comme spécifiquement liée à l'entrée en état VNC (Muela, *et al.*, 2008). Enfin, les teneurs d'ADN et d'ARN présents dans les cellules en VNC semblent être modifiés aussi, il a été montré que le niveau de synthèse de l'ADN et de l'ARN était diminué en état VNC (Nilsson, *et al.*, 1991).

I.3.5. Virulence

La plupart des microorganismes pour lesquels l'état VNC a été étudié sont des bactéries pathogènes, certains des gènes exprimés correspondent à des toxines, il semble donc que les souches restent virulentes même en état VNC. Des facteurs de virulence sont conservés chez *Helicobacter pylori*, avec *murG* codant une glycosyltransférase. Cette enzyme est impliquée dans la formation du peptidoglycane chez des cellules VNC d'*Enterococcus faecalis*. Ces résultats laissent à penser que la paroi qui a un rôle essentiel dans le maintien de la virulence des bactéries, est également impliquée de près dans l'entrée des cellules en VNC. Un autre gène impliqué dans la virulence des bactéries est *RpoS*. Ce gène est impliqué dans le maintien de la virulence de *E. coli* en état VNC (Signoretto, *et al.*, 2002).

I.3.6. Ressuscitation

Pour qu'une population soit considérée comme VNC, il faut qu'elle puisse ressortir de cet état et regagner sa capacité à se multiplier : on parle alors de « réanimation » ou « ressuscitation ». L'hypothèse de l'état VNC est basée sur le fait que les cellules sont capables de retrouver leur capacité à se multiplier, et donc retrouver un métabolisme normal lorsque les conditions environnementales s'améliorent. Cette ressuscitation a fait l'objet de forts débats (Nyström, 2001), puisque certains suggèrent que la reprise de cultivabilité est due à la présence et à la reprise de croissance de quelques cellules au métabolisme normal résiduelles dans une population majoritairement VNC. Mais la récupération de la division cellulaire chez une population de cellules en VNC a été décrite de façon non ambiguë pour de nombreuses bactéries (Zhong, *et al.*, 2009). Pour certaines espèces, l'élimination du stress environnemental peut

suffire à entraîner la sortie des cellules, alors que pour d'autres bactéries, il est nécessaire d'ajouter des nutriments au milieu pour engendrer la sortie de VNC. Par exemple, la bactérie *V. vulnificus* qui entre en VNC avec des températures faibles, peut en sortir simplement par augmentation de la température de culture (**Oliver et Bockian, 1995**). Pour d'autres bactéries pathogènes l'injection de cellules VNC dans un hôte provoque une ressuscitation des cellules. C'est le cas pour *Legionella pneumophila* chez l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* (**García, et al., 2007**).

Dr. Sandra Amri

Chapitre II : Interactions entre microorganismes

II. 1. Signaux et communication

Le système de communication bactérien appelé Quorum-sensing (QS), découvert initialement sur des bactéries marines bioluminescentes (**Ruimy et Andreumont, 2004**). Le QS a été découvert dans les années 70 au cours de l'étude de la bioluminescence. Plus précisément, cette étude était consacrée à la production de bioluminescence par une bactérie marine, *Vibrio fischeri* vivant en association avec une sépiole *Euprymna scolopes* (**Nealson et al., 1970**). L'émission de bioluminescence permet à la seiche de se camoufler afin d'échapper à ses prédateurs en imitant le rayonnement lumineux du soleil et de la lune dans l'océan. Ce phénomène est appelé la contre illumination. Lorsque la bactérie *Vibrio fischeri* vit à l'état libre dans l'eau de mer au sein du bacterioplancton et qu'elle n'est pas en densité suffisante, elle n'émet pas de luminescence, car la faible quantité de molécules signal produit diffus librement dans l'eau de mer. Par contre, lorsque la bactérie *Vibrio fischeri* colonise l'organe photophore de la seiche (**Ruby et Lee, 1998**), elle se multiplie dans un espace restreint dans lequel les cellules bactériennes arrivent à la quantité seuil de cellules dans la colonie et déclenchent l'expression des gènes impliqués dans la production de la bioluminescence. Chaque matin l'animal expulse une partie de la colonie bactérienne de *Vibrio fischeri*, pour éliminer les cellules bactériennes sénescents et éviter d'émettre de la lumière lorsqu'elle va se reposer au fond de l'océan. Elle ne conserve que 5 % des bactéries qui se multiplient jusqu'à ce que la colonie atteigne à nouveau le soir venu la quantité seuil de cellules permettant d'atteindre le quorum de molécules signal. L'expression des gènes de l'opéron *Lux* est alors activée et les bactéries émettent simultanément de la lumière. C'est le confinement des bactéries dans l'organe de la sépiole, limitant la diffusion des molécules signal bactérienne dans le milieu extérieur qui permet d'atteindre rapidement le quorum (ou concentration seuil) de cellules bactériennes et de molécules signal nécessaire à l'activation de l'opéron *lux*. Cette première molécule signal bactérien a été nommée autoinducteur de type 1 (AI-1). Elle a été mise en évidence chez une bactérie à Gram négatif et identifié en 1981 comme étant une acyl-homoserine lactone. Puis en 1984, c'est le gène codant l'enzyme de la voie de biosynthèse qui a été mis en évidence. Enfin en 1994, le nom de quorum sensing apparaît pour la première fois, depuis d'autres types de molécules signal impliqués dans le mécanisme de quorum sensing ont été mis en évidence chez des bactéries à Gram négatif et positif. Le QS apparaît comme une caractéristique réponde chez les cellules bactériennes (**Engebrecht et al., 1983**).

II. 2. Quorum sensing bactérien

Le QS est un mécanisme de signalisation intercellulaire favorisant la coopération bactérienne intra et interspécifique, ce mécanisme moléculaire permet aux bactéries de communiquer entre elles via des molécules dites signal. Ces dernières sont synthétisées grâce à des enzymes, ce système repose sur la densité de cellules bactériennes présentes dans la colonie et sur la quantité de molécules signal présent dans l'environnement proche de ces bactéries (Miller et Bassler, 2001). La quantité de molécules signal est directement liée au nombre de cellules bactériennes dans la colonie, ainsi dans l'environnement où elles se situent, lorsque la densité bactérienne de la colonie augmente, la concentration de molécules signal augmente par voie de conséquence, jusqu'à atteindre un certain seuil ou quorum à partir duquel l'activité bactérienne en question est activée ou bien supprimée selon le cas (Water et Bassler, 2005). Certains phénotypes bactériens gouvernés par le mécanisme de QS sont dépendant de la densité cellulaire de la population ainsi que la concentration en molécule signal. En effet, lorsque les molécules signal sont en quantité suffisante elles se lient à leur récepteur protéique intracellulaire et l'ensemble se comporte en facteurs de transcription en se fixant à l'ADN pour réguler les gènes ciblés. Dans le cas d'autoinducteur de type 1, il entraîne une surproduction de molécule signal ayant pour effet d'amplifier le phénomène. Un endroit confiné favorise l'augmentation de la concentration en molécules signal alors qu'un endroit ouvert favorise leur diffusion et ne permettant pas d'atteindre le quorum. Ces molécules signal produites et détectées à de faibles concentrations (1 pmol et 1 µmol) par les bactéries. Un grand nombre de bactéries possèdent plusieurs voies de QS qui sont souvent interconnectées. Ce système coordonne et synchronise l'expression d'une multitude d'activités bactériennes au sein de la communauté par exemple la formation de biofilm, la nodulation, l'émission de bioluminescence, la production de facteur de virulence, la mobilité, le transfert d'ADN et la production de produits extracellulaire. La population bactérienne agit donc ainsi dans un intérêt commun. De plus, le QS permettrait également aux bactéries de vérifier la présence d'un nombre suffisant de cellules dans la colonie afin que l'expression d'une activité bactérienne coûteuse en énergie comme celles citées ci-dessus ne soit pas vaine et que son impact soit maximisé (Doberva, 2016).

II. 2.1. Phénotypes régulés par quorum sensing chez les bactéries

La communication entre bactéries permet aux populations bactériennes de coordonner leurs réponses, d'agir comme un organisme pluricellulaire (Waters et Bassler, 2005). Ce qui leur confère un avantage écologique lorsqu'il s'agit d'utiliser des sources nutritives complexes,

d'accéder à certaines niches écologiques et de se défendre. Le QS permet la régulation et la synchronisation de nombreuses activités bactériennes, certaines sont présentées ci-après :

II.2.1.1. Nodulation

La nodulation est la formation de nodules ou boursouflures au niveau des racines de certaines plantes, ces nodules contiennent de bactéries du genre *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec la plante et qui lui permettent d'avoir accès à de l'azote sous forme de NH_4^+ . La mise en place de ces nodules est directement liée à la densité de cellules bactériennes présentes dans le sol. Cette activité est régulée par les acyl-homoserine lactones ou AI-1 et la bradyoxetone (CDF). Ce type de phénomène n'a jamais été observé dans l'environnement marin (Yang *et al.*, 2009).

II.2.1.2. Facteur de virulence

La production de facteur de virulence est gérée par le mécanisme de QS chez plusieurs bactéries à Gram – et à Gram + tels que : *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Ce mécanisme permet à ces dernières de maximiser leur impact vis-à-vis de leur hôte. Les molécules signal impliquées dans la régulation de ce processus sont l'AI-1, le PQS (Pseudomonas Quinolone Signal), le PAME (3-hydroxy Palmitic Acide Methyl Ester) et enfin l'AIP (Auto-Inducing Peptide) pour les bactéries à Gram + (Flavier *et al.*, 1997). Chez les bactéries marines appartenant au genre *Vibrio* la régulation de l'expression de facteurs de virulence par le QS a clairement été établie (Milton *et al.*, 2006).

II.2.1.3. Mobilité bactérienne

Le QS régule aussi la mobilité bactérienne qui comporte deux types : la nage et l'essaimage. La mobilité bactérienne est possible d'une part, grâce à la présence de flagelles et d'autre part, à la sécrétion de biosurfactants permettant la diminution de la tension de surface qui sont régulés par le mécanisme de QS (Zan *et al.*, 2015). La construction d'un flagelle est basée sur la voie de QS reposant sur les AI-1, alors que celle de biosurfactants dépend des AI-2 (Auto-inducteur de type 2). Ces deux activités sont également liées à la formation du biofilm puisqu'elles permettent la colonisation d'une surface par les bactéries (Daniels *et al.*, 2004). Par exemple, la mobilité bactérienne est contrôlée par le QS chez la bactérie du genre *Yersinia* connu par sa grande pathogénicité (Atkinson *et al.*, 2006). En milieu marin la régulation de la

mobilité bactérienne a été mise en évidence chez les bactéries du genre *Ruegeria* qui vit en association avec les éponges (Zan *et al.*, 2015).

II.2.1.4. Fructification

La fructification est une activité bactérienne décrite chez les *Delta-Proteobacteria* du sol comme : *Myxococcus xanthus*. Elle consiste par la formation d'un corps de fructification en réponse à un manque de nutriments dans le milieu. Le corps de fructification est formé par l'agrégation de plusieurs cellules bactériennes et porte des spores. Plusieurs signaux protéiques nommés A, B, C, D et E seraient impliqués dans ce processus, seuls les signaux A et C ont été caractérisés. Ce phénotype et sa régulation par QS n'ont pas encore été explorés dans l'environnement marin (Konovalova *et al.*, 2012).

II.2.1.5. Transfert d'ADN

Chez les bactéries, 3 modes de transfert d'ADN sont connus : la conjugaison, transformation et transduction. Les 2 premiers sont connus pour être régulés par le QS. L'exemple le plus connu de conjugaison bactérienne est celui d'*Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie pathogène qui induit la formation d'une tumeur au niveau du collet des plantes. La bactérie transfère son plasmide Ti aux cellules de la plante et c'est l'expression des gènes portés par ce plasmide qui favorise la formation de la tumeur. Ce plasmide comporte notamment deux gènes, *traI* qui code une AI-1 synthase et *traR* qui code pour le récepteur à l'AI-1 (Sabater *et al.*, 2002). Le transfert d'ADN est aussi géré par le mécanisme de QS basé sur les AI-1 chez la bactérie marine *Rhodobacter capsulatus*. La transformation bactérienne a été bien caractérisée chez *Streptococcus pneumoniae* chez qui l'accumulation de l'AIP (Auto-Inducing Peptide) permet l'activation des gènes impliqués dans la compétence bactérienne (Lee et Morrison, 1999).

II.2.1.6. Biofilm

Les bactéries peuvent vivre de manière libre ou bien attachées à des surfaces où elles peuvent former un biofilm. Celui-ci constitué d'une matrice extracellulaire produite par les bactéries elles-mêmes, leur confère une protection face aux agressions extérieures (organisme bactériovores, molécules antibactériennes...). La construction et l'inhibition de ce biofilm sont régulées par le QS basé sur les AI-1. Une des bactéries les plus étudiées pour la formation de biofilm est *Pseudomonas aeruginosa* qui est responsable d'infections nosocomiales récalcitrantes en milieu hospitalier (Høiby *et al.*, 2010). La formation de biofilms a aussi été mise en évidence

chez des bactéries marine de la famille des *Rhodobacteraceae*. De plus, la formation de biofilms régulés par QS en milieu marin est souvent la première étape du phénomène de biofouling ou colonisation des surfaces par des microorganismes et des macroorganismes (Elifantz *et al.*, 2013).

II.2.1.7. Produits extracellulaires

Les QS contrôle la production de différents produits extracellulaires tels que : des enzymes, toxines, antibiotiques, sidérophores et pigments (Schuster *et al.*, 2003). La régulation de la production de pigments par le QS basé sur les AHL ou AI-1 a été mise en évidence chez la bactérie *Chromobacterium violaceum*, et également chez la bactérie marine *Phaeobacter gallaeciensis*. La synthèse d'antibiotiques est contrôlée par les AHLs, il a été mis en évidence chez les bactéries des genres *Burkholderia* qui produit des phénazines. *Serratia* qui produit la pyrrolnitrine. *Erwinia* qui synthèse un carbapenem et enfin chez la bactérie du sol à Gram +, l'activité des *Streptomyces* est gérée par le GBL (Gamma Butyro Lactone). De plus la bactérie marine *Phaeobacter gallaeciensis* régule la production d'acide tropodithiétique grâce aux mécanismes de QS basé sur les AI-1 (Doberva, 2016)

II.2.1.8. Incorporation du phosphore

Le QS basé sur l'AI-1 et AI-2 régule l'acquisition du phosphore par les cyanobactéries marines à partir du phosphore organique dissous présent dans l'environnement marin. Les AI-1 favorisent l'activité ATPase et donc l'incorporation du phosphore alors que les AI-2 limitent cette activité (Hmelo *et al.*, 2011).

II.2.1.9. Morphologie cellulaire

La morphologie des cellules de *Dinoroseobacter shibae*, une bactérie marine (famille : *Rhodobacteraceae*) vivant en association avec un dinoflagellé est sous l'influence des AHLs. En effet, lorsque la bactérie ne plus produire du AHL sa morphologie est constante. Alors que, lorsqu'elle en produit elle peut prendre différentes formes en fonction de son environnement (Patzelt *et al.*, 2013).

II.2.1.10. Bioluminescence

Déjà vus (Chapitre II. §. II.1. Signaux et communication).

II.2.2. Molécules signal chez les bactéries

Les molécules signal varient selon les espaces bactériennes, elles peuvent être résumées comme suit :

- **Auto-inducteur de type 1 (AI-1) :** Les acyl-Homo-Sérine-Lactone ou AHLs, sont les auto-inducteurs de type 1(AI-1), ils sont produit principalement par les bactéries à Gram négatifs. Les AHLs sont efficaces à des concentrations très faibles autour de 0,1 à 400 nM (Galloway *et al.*, 2011). L'enzyme clé de la voie de biosynthèse des AHLs est AHL synthase, cette enzyme est codée par 3 familles de gènes *luxI*, *ainS* et *hdtS* (Fuqua et Greenberg, 2002).

- **L'auto-inducteur de type 2 (AI-2) :** a été identifié plus récemment, et permet une communication entre les bactéries à Gram – et +, deux formes ont été isolée à partir de *Vibrio harveyi* et *Salmonella typhimurium*. L'enzyme clé dans la synthèse d'AI-2 est codé par le gène *luxS* (Doberva, 2016).

- **Les Auto-inducteur de type 3 (AI-3) :** sont présent chez les entéropathogènes de type Entero- Hémorragique *Escherichia coli* (EHEC), le gène *luxS* serait également impliqué dans la voie de synthèse de AI-2. Cet autoinducteur serait reconnu par les cellules intestinales des mammifères (Walters et Sperandio, 2006).

- **Cholerae auto-inducteur (CAI) :** Le CAI est une molécule signal synthétisé par une enzyme CqsA, cette molécule signal est produite par de nombreuses espèces du genre *Vibrio* et elle participe à la régulation de la production des facteurs de virulence (Doberva, 2016).

- **Le 3-Hydroxy Palmitic Acid Methyl Ester (PAME) :** Le PAME est une molécule signal volatile produite par une bactérie du sol *Ralstonia solanacearum*. L'enzyme clé de la biosynthèse est une Sadenosyl methionine dependent methyl transferase codée par le gène *phcB*. Le PAME entainent l'expression des facteurs de virulences (Flavier *et al.*, 1997).

- **Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) :** Le PQS est un signal moleculaire présent chez le genre *Pseudomonas*, il est codé par gene *pqsH*. Il permet l'activation de l'AHL synthase (McKnight *et al.*, 2000).

- **DiKetoPiperazines (DKPs) :** Les DKPs sont des signaux moléculaires capables d'activer les récepteurs des AHLs, plusieurs espèces sont capables d'émettre ce signal comme :

Pseudomonas aeruginosa, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* et *Vibrio spp.* Ces DKPs ont un effet antifongique, de même se signale permet l'activation des gènes codant une protéine membranaire et la toxine du cholerae (**Jimenez et al., 2012**).

- **Diffusible Signal Factor (DSF)** : Le DSF a été mis en évidence chez *Xanthomonas campestris*, une bactérie du sol qui ne produit pas les AHLs, puis chez d'autres bactéries comme *Burkholderia cenocepacia*, *Xylella* et *Stentrophomonas*. Ces DSF régulent la production des facteurs de virulences (**Atkinson et Williams, 2009**).

- **Butyrolactone (GBL)** : Les GBL sont produit par des bactéries à Gram + telles que *Streptomyces* et permettent la régulation de la production des antibiotiques. Les gènes *scgA* et *scgX* sont impliqués dans la production de GBL (**Slattery et al., 2001**).

- **Facteur A/B/C/D/E** : L'espèce *Myxococcus xanthus* (*Delta proteobacteria*) utilise une molécule signal formée de 5 peptides nommés facteur A/B/C/D/E. Parmi ces derniers, seuls les facteurs A et C ont été identifiés. Les gènes impliqués dans la synthèse de ces protéines sont *asg* pour le facteur A, *bsg* pour le facteur B, *csg* pour le facteur C, *dsg* pour le facteur D et *esg* pour le facteur E (**Konovalova et al., 2012**).

- **Auto-Inducing Peptides (AIP)** : Les bactéries à Gram + utilisent des signaux d'AIPs, plusieurs types ont été identifiés chez le genre *Streptococcus* qui lui permet de réguler sa capacité à absorber de l'ADN. Chez *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*, ils favorisent la régulation des facteurs de virulences. Chez *Bacillus subtilis* il contrôle la sporulation (**Doberva, 2016**).

- **Bradyoxetine (CDF)** : La CDF est une molécule produite par l'espèce *Bradyrhizobium japonicum*, elle est détectées chez plusieurs autres bactéries des *alpha Proteobacteria* (**Loh Carlson et al., 2002**), le gène impliqué dans la biosynthèse n'a pas encore été identifié. La CDF serait activée par une faible quantité de Fe^{3+} et une forte densité cellulaire, cette molécule signal permettrait la régulation de la nodulation chez les légumineuses (**Jitacksorn et Sadowsky, 2008**).

- **Acide indole 3 acétique (IAA)** : L'IAA est une molécule de communication permettant aux bactéries marines d'interagir entre elles et avec les diatomées marines. Cette molécule est également une hormone végétal appelée auxine, qui sert de messenger chimique entre les cellules du végétal (**Doberva, 2016**).

• **Acide tropodithietique (TDA)** : Le TDA est une molécule ayant des propriétés antibiotiques qui est produite par plusieurs bactéries marines de la famille des *Rhodobacteraceae*. La voie de biosynthèse de cette molécule est codée par les gènes *tda*, *cycI*, *malY*, *paaIJK* et *tdaH*. La famille des *Rhodobacteraceae* produisent le TDA lorsqu'elles forment les biofilms (Doberva, 2016).

II.3. Interactions et dynamique des populations microbiennes

II.3.1. Définition

On désigne par dynamique des populations, l'ensemble des individus d'une même espèce vivant dans un même milieu et pouvant se reproduire entre eux. Sur une telle population, il sera possible de définir des phénomènes globaux de multiplication et de mortalité à partir desquels on décrira et on suivra dans le temps des variables dites démographique à savoir la durée de vie et l'abondance des espèces (Frontier et Pichod-Viale, 1990).

II.3.2. Cinétique de croissance des populations bactériennes

Depuis la première description de Buchanan (1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication. On reconnaît classiquement sept phases successives (Figure 05) :

1. Phase stationnaire initiale ou phase de latence. Elle est caractérisée par une vitesse de multiplication nulle. Cette phase correspond à une période d'adaptation de la bactérie à son nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules et éventuellement de la densité bactérienne (Winslow et Wilson, 1939).

2. Phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale. Cette phase est considérée par certains auteurs comme faisant partie de la phase de latence (Monod, 1958).

3. Phase de croissance à vitesse constante maximale ou phase de croissance exponentielle. Elle se présente sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps. Pour une bactérie donnée, la valeur de cette vitesse de croissance maximale dépend des caractéristiques du milieu de culture (Buchanan, 1918).

4. Phase de diminution de la vitesse de croissance qui progressivement devient nulle.

5. Phase stationnaire maximale ou plus simplement phase stationnaire qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des microorganismes (**Monod, 1958**).

6. Phase de début de décroissance (**Monod, 1958**).

7. Phase de décroissance à vitesse constante (**Monod, 1958**).

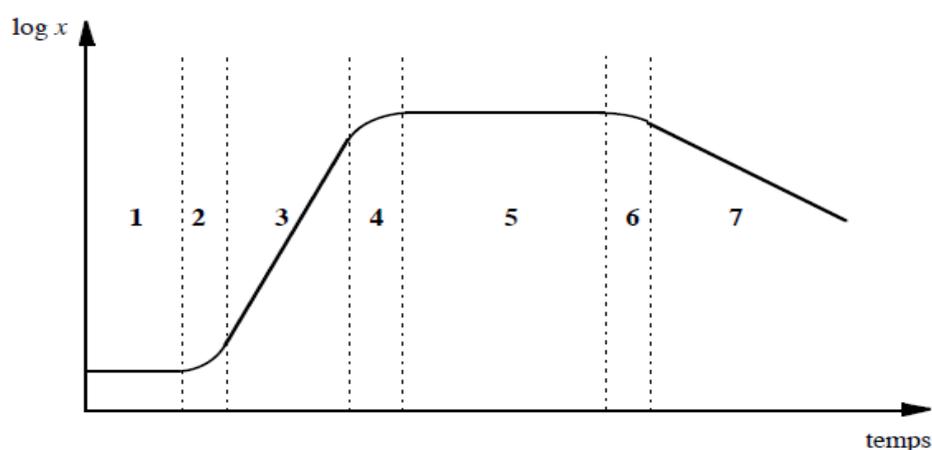


Figure 05 : Courbe de croissance bactérienne et ses différentes phases (**Buchanan, 1918**).

La cinétique de croissance des cultures bactériennes est donc essentiellement composée d'une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis d'une phase stationnaire. Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres suivants pour caractériser ces différentes phases : la densité cellulaire initiale (x_0), le temps de latence (lag), la vitesse de multiplication maximale (μ_{max}) ou le temps de génération (Tg) et la densité maximale atteinte (x_{max}). Le temps de latence, lag , est classiquement défini par **Lodge et Hinshelwood, (1943)** comme étant l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) avec la droite horizontale passant par la concentration initiale x_0 (**Figure 06**). **Buchanan et Cygnarowicz (1990)** ont récemment proposé de définir le temps de latence comme étant le point d'accélération maximale de la vitesse de multiplication. Ces deux définitions peuvent aboutir à des valeurs différentes de la durée de la phase de latence en fonction du modèle utilisé pour décrire la cinétique de croissance, nous retiendrons donc dans la suite de cette étude la définition classique du temps de latence. La vitesse de multiplication ou taux de croissance maximum (μ_{max}), est la pente correspondant à la phase exponentielle (en

coordonnées semi-logarithmiques). Les microbiologistes utilisent également le temps de génération, (Tg), qui est lié au taux de croissance maximum par la relation : $Tg = \ln 2 / \mu_{\max}$ (Zwietering *et al.*, 1992).

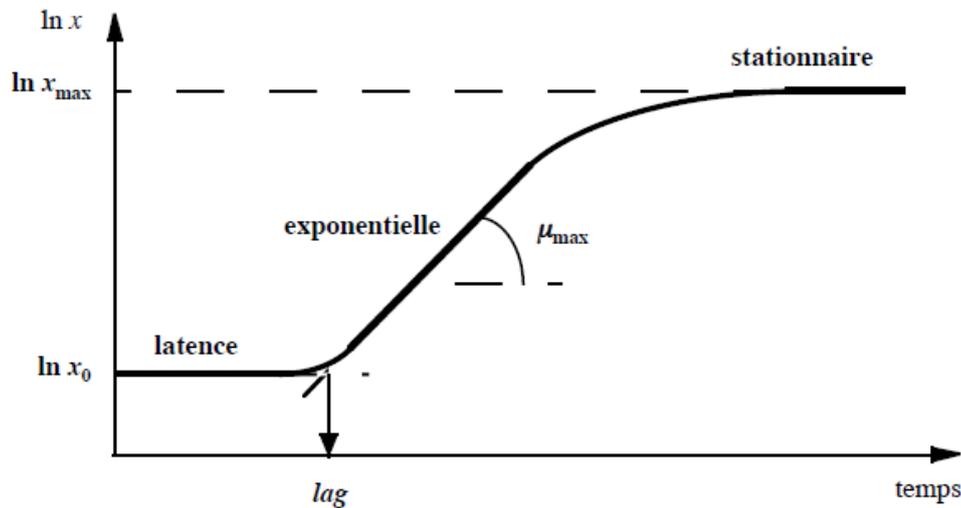


Figure 06 :Principales phases de la courbe de croissance bactérienne (Zwietering *et al.*, 1992).

II.4. Succession microbienne : conséquence pour la biodégradation des composés organiques et en agronomie

II.4.1. Succession microbienne

Avant de parler de la succession, il est nécessaire d'entamer la dispersion et la colonisation. Afin de pouvoir disséminer d'un habitat à un autre, les microorganismes doivent pouvoir survivre dans les conditions de non croissance tout le long de leur transfert, un grand nombre de bactérie présente des formes de transport et de survie, comme les endospores et les conidiospores, qui présentent leurs fonctions vitales pendant plusieurs jours, semaines ou années. D'autres microorganismes peuvent survivre pendant de longue période dans les déchets fixés aux serres des oiseaux, dans leur tube digestif ou au sein des matières végétales et animales qu'ils ont ingéré. Ces oiseaux servent de vecteurs intercontinentaux aux microorganismes. Les microorganismes les mieux étudiés pour leurs capacités de migration sur de longues distances sont les champignons, dans des conditions favorables de dispersion, leurs spores peuvent être transportées sur plusieurs kilomètres. Chez les ruminants, la dissémination et la colonisation revêtent un autre aspect. Ils entretiennent dans leur estomac une riche communauté de bactéries anaérobies (Perry *et al.*, 2004).

II.4.2. Conséquence pour la biodégradation des composés organiques et en agronomie

Le terme matières organiques regroupe l'ensemble des constituants organiques morts ou vivants d'origine végétale, animale ou microbienne transformés [2]. La biodégradation est la dégradation moléculaire d'une matière organique résultant de l'action de micro-organismes, cette dernière peut être qualifiée de primaire ou biodégradation fonctionnelle, c'est la biodégradation partielle d'une substance organique. Ou bien de biodégradation totale, ou biodégradation ultime, c'est la biodégradation complète de la structure moléculaire avec formation de dioxyde de carbone, d'eau, de méthane (en anaérobiose), de dérivés minéraux ou de constituants des microorganismes (Kuenemann, 1991).

II.4.2.1. Activités microbiennes dans les sols

L'activité des micro-organismes du sol ne se manifeste que si les conditions énergétiques et nutritionnelles sont satisfaites, les nutriments doivent répondre à 3 besoins : fournir de l'énergie pour la croissance, fournir des matériaux pour la synthèse des constituants cellulaires et être utilisables comme accepteurs des électrons libérés au cours de la production d'énergie (Figure 07). Les conditions environnementales affectent l'activité des microorganismes du sol (Tableau 03), beaucoup de ces conditions sont contrôlables et peuvent être modifiées pour augmenter la biodégradation des composés organiques, si cela est nécessaire (Sims *et al.*, 1990 ; Bidaud, 2013).

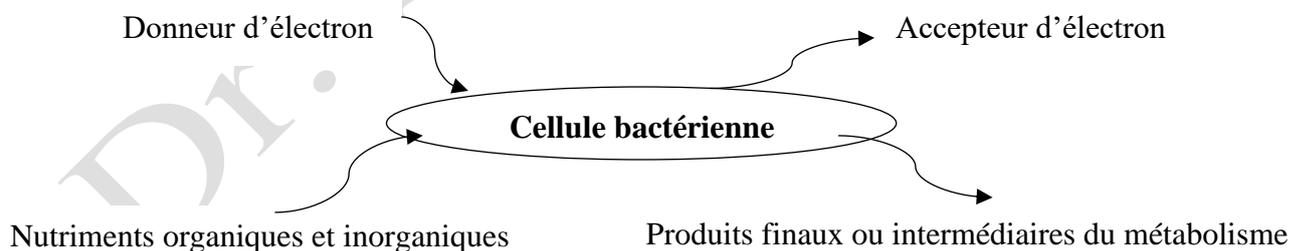


Figure 07 : Schéma général de l'activité microbienne (Bidaud, 1998).

Tableau 03 : Optima des conditions environnementales pour la croissance microbienne (Sims *et al.*, 1990).

Facteurs environnementaux	Niveaux optimum
Eau	25-85 % de la capacité de rétention de l'eau, potentiel hydrique = 0,01 MPa
Oxygène	Métabolisme aérobie : oxygène dissous > 0,2 mg/L. Métabolisme anaérobie : oxygène dissous < 1 %.
Potentiel redox	Aérobie et aérobie facultative : > 50 mV. Anaérobie : < 50 mV, pH = 5,5 -8,5.
Nutriments	Suffisamment d'azote, de phosphore et d'autres nutriments pour ne pas inhiber la croissance microbienne (le ratio C : N : P est de 120 : 10 : 1).
Température	15-45°C

II.4.2.2. Processus généraux de biodégradation des composés organiques

Les micro-organismes, et particulièrement les bactéries, sont présents dans tous les sols, ils représentent la voie majeure de dégradation des composés organiques issus des végétaux. L'introduction relativement soudaine de xénobiotiques (pour la plupart des molécules organiques) ou le stockage massif de composés naturels peut dépasser la capacité de dépollution de l'écosystème perturbé. Cela résulte en l'accumulation des polluants à des niveaux préoccupants, voire dangereux. Les processus de biodégradation se développent en général spontanément dans le sol, mais certains nécessitent une phase plus ou moins longue d'adaptation à la dégradation de ces différents produits (Gottschalk and Knackmuss, 1993).

a) Adaptation à la dégradation : La capacité des populations microbiennes de s'adapter à la dégradation des composés organiques incluent la sélection naturelle de mutants possédant les enzymes de dégradation avec des spécificités de substrat larges, ou même avec de nouvelles activités métaboliques. Le phénomène d'adaptation peut être défini comme les changements intervenant à la suite d'une perturbation et visant à rétablir un nouvel équilibre dans la communauté microbienne (Aelion *et al.*, 1987). Dans le cas de l'adaptation génétique des microorganismes, l'évolution correspond à un processus de mutations spontanées des voies métaboliques préexistantes ou bien à l'expression de nouvelles capacités cataboliques codées sur des fragments d'ADN, généralement des plasmides, acquis par les microorganismes (Van der Meer *et al.*, 1992). L'adaptation des micro-organismes dépend de nombreux

facteurs environnementaux, comme la concentration de matières organiques, le temps d'exposition, la densité en microorganismes et le pH (Comeau *et al.*, 1993).

b) Principaux processus de biodégradation : Différents processus impliqués dans la biodégradation ont été définis, ce sont la minéralisation, le cométabolisme, la polymérisation et les effets secondaires de l'activité microbienne. La biotransformation d'une molécule peut faire intervenir un ou plusieurs processus simultanément ou successivement et conduire à la formation de différents produits issus du métabolisme d'un ou plusieurs microorganismes. L'amplitude de la transformation dépend de différents facteurs biotiques et abiotiques, comme la température, l'humidité, le pH et la concentration de l'oxygène dans le sol (Bollag et Loll, 1983). Les principaux processus impliqués sont :

La minéralisation : C'est la conversion d'une molécule organique en constituants inorganiques, c'est donc le processus le plus intéressant, car il conduit à une épuration totale du milieu. La matière organique est utilisée comme source de carbone et d'énergie. La minéralisation a lieu lorsqu'un composé organique est attaqué par les mécanismes cellulaires cataboliques et anaboliques. Les organismes responsables tirent en général profit des réactions de minéralisation : une croissance microbienne est attendue et une partie du carbone initialement dans la molécule organique est en général incorporée dans la biomasse (Madsen, 1991).

Le cométabolisme : C'est la modification fortuite d'une molécule par une enzyme qui agit sur une autre molécule (substrat primaire). Le substrat primaire est le support de la croissance de micro-organismes qui produisent une ou plusieurs enzymes de faible spécificité agissant aussi sur le substrat cométabolisé. Ce dernier est en général faiblement altéré et n'entre pas dans les chemins cataboliques et anaboliques de la cellule microbienne. Par conséquent, l'organisme responsable ne profite pas des réactions de cométabolisme. La croissance microbienne n'est pas un corollaire et on n'attend pas d'accélération des réactions de cométabolisme. Toutefois, d'autres organismes peuvent être capables de minéraliser les produits du cométabolisme (Alexander, 1981).

La polymérisation : Les molécules organiques ne sont pas toujours dégradées directement mais polymérisées. Dans ce processus, les molécules s'associent avec elles-mêmes, ou avec d'autres xénobiotiques et des composés naturels. Elles sont alors incorporées à la

matière organique du sol et peuvent être relarguées de manière incontrôlée suivant l'activité microbienne du sol (**Bollag et Loll, 1983**).

La biodégradation non-enzymatique : Les micro-organismes peuvent contribuer à la dégradation de la matière organique de manière indirecte, l'activité microbienne se traduit souvent sous la forme d'une acidification ou d'une alcalinisation (cycle de l'azote) du milieu environnant. Aussi, elle pourra entraîner des modifications de pH qui provoqueront des hydrolyses acides ou alcalines de certains composés (**Bollag et Loll, 1983**).

Dr. Sandra Amri

Chapitre III : Interactions avec les organismes supérieurs

L'interaction est un caractère fondamental du vivant tout comme le métabolisme, elle prend des formes diversifiées particulièrement chez les microorganismes, ces derniers interagissent non seulement entre eux mais aussi avec des plantes et les animaux. Une interaction désigne un processus impliquant des échanges ou des relations réciproques entre deux ou plusieurs éléments (espèces, groupes...) dans un écosystème (relations interspécifiques), ou entre deux ou plusieurs individus d'une même population (relations intraspécifiques) (Ricklefs et Miller 2000).

III.1. Différents interactions biologiques

Aucune espèce ne vit seule dans son environnement : elle interagit avec celui-ci mais aussi avec les autres espèces présentes qui forment avec elles une communauté. Les interactions interspécifiques sont une des clés de fonctionnement et de structuration des écosystèmes et aussi un des moteurs de l'évolution via les pressions sélectives dont elles font l'objet. Le **tableau 04**, représente les principales catégories d'interactions selon leurs effets nets sur chacun des deux participants, pour cela on distingue trois grands types d'effets entre espèces : (+) : bénéfique pour le partenaire considéré ; (-) : nocive, négative pour le partenaire ; (0) : neutre, sans effets (Bronstein, 2015).

Tableau 04 : Principales interactions biotiques (Combes, 2001).

	A	B	Interactions
Bénéficie	+	+	Mutualisme
	+	0	Commensalisme
	+	-	Parasitisme
	-	-	Compétition

Il apparaît évident que les interactions entre espèces jouent un rôle central dans le fonctionnement et l'évolution des écosystèmes, les flux de matière et d'énergie notamment sont influencés par les relations trophiques. De même, la structure des communautés (richesse et composition spécifique, abondances relatives), bien que fortement dépendante des conditions abiotiques (conditions climatiques, disponibilité en lumière, eau, nutriments), est également influencée par les interactions interspécifiques qui y ont lieu. Enfin, les interactions entre espèces sont un moteur de diversité. En effet, chaque partenaire peut exercer des pressions de

sélection sur l'autre, affectant ainsi la survie et/ou la reproduction. En réponse à ces pressions, une des espèces partenaires peut subir une modification de traits susceptible d'influencer à son tour des traits de l'autre espèce (**Begon *et al.*, 2006**).

III.1.1. Parasitisme

Le parasitisme est une interaction durable entre deux organismes d'espèces différentes dont l'un tire bénéfice (le parasite) au détriment de l'autre (l'hôte) (**Léveque et Mounolou, 2008**). Certaines maladies des plantes sont causées par des champignons et des virus qui pénètrent souvent par des blessures, ainsi que de nombreuses bactéries foliaires sont phytopathogènes. **Exemple 1** : *Erwinia amylovora* responsable du « feu bactérien » sur poirier et pommier, *Xanthomonas campestris* agent responsable des lésions et nécrose sur le limbe.

Exemple 2 : *Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie retrouvée dans les sols, c'est un parasite des végétaux responsable d'une maladie appelée galle du collet (ou en anglais : *crown-gall*).

III.1.2. Symbiose

La définition de la symbiose évolua lorsque pour la première fois, Alfred William Bennett en 1877 (botaniste britannique) puis Anton de Bary en 1879 (botaniste, microbiologiste et mycologue allemand, étudiant notamment les lichens) proposèrent une nouvelle façon d'employer le mot « symbiose » pour définir un nouveau type d'interaction entre deux organismes. La notion de « bénéfices mutuels » vint compléter cette définition initiale de la symbiose et la nouvelle définition fut progressivement acceptée à partir de 1881. Finalement, les scientifiques de l'époque s'accordèrent à définir ce phénomène comme un état durable d'associations physiques d'au moins deux organismes appartenant à des espèces différentes parmi lesquelles au moins l'un en tirent des bénéfices (**Perru, 2006**).

III.1.2.1. Commensalisme

Le commensalisme est une interaction symbiotique où l'un des deux micro-organismes en tire un bénéfice mais l'autre n'en tire ni avantage, ni inconvénient (**Léveque et Mounolou, 2008**). **Exemple** : La bactérie chimiolithotrophe nitritante *Nitrosomonas* transforme l'ammonium en nitrite alors que la bactérie chimiolithotrophe nitratante *Nitrobacter* transforme le nitrite en nitrate. Par conséquent *Nitrobacter* dépend de ce que *Nitrosomonas* lui fournit alors que le bénéfice que cette dernière tire de la présence de *Nitrobacter* est moins évident.

III.1.2.2. Mutualisme

Le mutualisme est une association symbiotique entre deux espèces vivantes à bénéfices réciproques, dans le cas d'une association obligatoire, la relation est appelée symbiose (**Léveque et Mounolou, 2008**). **Exemple 1** : Dans le sol, les bactéries de la rhizosphère (exemple *Azotobacter* et *Frankia*) fixent l'azote et produisent des composés azotés utilisés par les plantes. En échange, la plante excrète au niveau des racines des sucres, des acides aminés et des vitamines qui stimulent la croissance des bactéries. D'autres bactéries dites rhizobia développe une symbiose avec des plantes légumineuses au niveau de nodules sur les racines ou les tiges, ces bactéries fixent à l'intérieur de ces nodules l'azote atmosphérique utilisé par la plante et en échange cette dernière leur assure les sucres, les acides aminés et les vitamines issus de la photosynthèse.

Exemple 2 : Au niveau du gros intestin, *E.coli* synthétise de la vitamine K et certaines vitamines, ces vitamines passent dans le sang circulant qui les distribue aux cellules qui ont besoin. Une autre bactérie, *Bifidobacterium bifidus*, dégrade des déchets issus du métabolisme du cholestérol et des acides biliaires. En échange le gros intestin fournit aux bactéries les nutriments essentiels à leur survie.

Exemple 3 : Certaines bactéries colonisent le jabot d'un oiseau folivore (consommateur de feuilles), le Hoazin (*Opisthocomys hoasin*). Ces bactéries permettent la digestion de la cellulose des feuilles, de la même manière que dans le rumen des ruminants. En échange le jabot fournit aux bactéries l'habitat et les nutriments essentiels à leur survie.

Exemple 4 : Des bactéries bioluminescentes comme *Photobacterium* sont souvent associées à des poissons ou des invertébrés marins. Ces bactéries sont hébergés dans des organes spécifiques chez leurs hôtes et émettent une luminescence grâce à une protéine particulière : la luciférase. Cette luminescence est utilisée par l'animal lors de divers comportement comme la reproduction, l'attraction des proies ou la dissuasion de prédateurs.

III.1.3. Compétition

La compétition fixe une limite aux possibilités de colonisation microbienne d'un biotope. Dans ce type d'interaction, deux ou plusieurs micro-organismes ont une même ressource environnementale limitée qu'il s'agisse d'un élément nutritif ou d'espace vital. La compétition permet la diversité microbienne. En effet, elle modifié l'équilibre entre les populations en stimulant des populations microbiennes à diversifier leur capacité métaboliques (**Léveque et Mounolou, 2008**).

III.1.4. Cométabolisme

Les bactéries ont en général des systèmes métaboliques complémentaires. En effet d'après **Prescott et al. (2003)**, certains isolats bactériens du sol incapables individuellement de métaboliser des composés polycycliques aromatiques, mais qui deviennent capables de la faire quand ils sont cultivés en consorsium. Ce dernier est un ensemble de souches capables de compenser les inhibitions provoquées par un composé en le dégradant, ou bien quand le produit d'une souche est utilisé comme substrat par une autre souche.

III.2. Interactions micro-organismes / végétaux

Divers types d'association s'établissent entre les plantes et les microorganismes, les interactions les plus importantes sont décrites ci-dessous :

III.2.1. Symbiose légumineuse

La symbiose légumineuse est une association durable entre deux êtres vivants et dont chacun tire bénéfice, cette association n'a rien d'obligatoire, car les bactéries peuvent être cultivées séparément et la plante peut pousser sans ces bactéries. Elle présente néanmoins un caractère bénéfique très net pour la plante-hôte, qui utilise pour son propre compte l'azote atmosphérique fixé par les *Rhizobium*, de son côté la bactérie trouve dans la nodosité un milieu nutritif favorable que la plante met à sa disposition. Ce type de symbiose a une grande importance économique pour l'homme, car nous savons que l'apport d'azote par la fixation racinaire est loin d'être négligeable pour l'agriculture (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

III.2.1.1. Fixateurs d'azotes symbiotiques

La fixation d'azote par des bactéries symbiotiques introduit chaque année dans les cycles biologiques 120 millions de tonnes d'azote (**Davet, 1996**). Le cas le plus connu concerne la fixation de l'azote dans les nodosités des *Fabaceae* par les *Rhizobium* (*Protobacteriaceae*) (**Laberche, 2004**). Ces bactéries sont responsables de l'apparition des nodosités mais peuvent vivre dans la rhizosphère, particulièrement au voisinage des racines des plantes. Elles peuvent parfaitement persister à l'état saprophytique mais dans ce cas, fixent peu ou pas d'azote (**Davet, 1996**). De nombreuses bactéries, appartenant à des groupes taxonomiques très différents sont capables de fixer l'azote atmosphérique indépendamment d'une relation symbiotique. Parmi ces bactéries autonomes fixatrices d'azote, on compte certaines bactéries appartenant aux genres

Azotobacter, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Methanococcus*. De même certaines cyanobactéries des genres *Gloeotheca*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Aulosira*, *Scytonema*, *Plectonema*, *Oscillatoria*. La quantité totale d'azote fixé par les bactéries libres, chaque année, représente environ 50 millions de tonnes (Lüttge *et al.*, 2002).

III.2.1.2. Rhizobia

On appelle rhizobia toutes les bactéries qui sont capables d'induire la formation de nodosités sur les racines ou tiges des plantes légumineuses où ils entreprennent la fixation symbiotique de l'azote. A l'état libre, les rhizobia vivent dans le sol et particulièrement dans la rhizosphère au voisinage des racines (Sahgal et Johri, 2003).

III.2.2. Processus de colonisation

La mise en place de la symbiose fixatrice d'azote entre les bactéries *Rhizobium* et leurs plantes-hôtes est un phénomène complexe, au cours duquel les bactéries doivent effectuer en parallèle deux processus : l'infection des racines de la plante-hôte et l'induction d'une organogenèse, qui conduit à la différenciation d'un nouvel organe, la nodosité (Figure 08). Le nodule est un organe vascularisé, qui abrite les symbiotes bactériens, leur assure les conditions nécessaires à l'activité fixatrice d'azote et favorise les échanges nutritifs entre les partenaires. Les rhizobia doivent être capable de pénétrer dans les tissus de l'hôte et y induire la nodulation, on dit qu'ils doivent être infectifs (Dommergues et Mangenot, 1970). Chez de nombreuses légumineuses, on a pu distinguer dans l'infection et la formation des nodules quatre phases principales :

III.2.2.1. Phase de pré-infection de la racine

Dans la phase de pré-infection, le processus commence par un échange de signaux moléculaires complexes entre les génomes de la plante-hôte et la bactérie. Cette phase comprend elle-même deux étapes (Tourte *et al.*, 2005) :

- **Multiplication des *Rhizobium* dans la rhizosphère de la légumineuse :** Les graines en germination de la légumineuse et la partie apicale des racines excrètent des flavonoïdes qui attirent et stimulent de façon sélective les rhizobia présents dans l'environnement (chimiotactisme). Il est évident que la densité élevée des rhizobia dans la rhizosphère est favorable à l'infection des racines ; néanmoins, quelques centaines de bactéries

peuvent infecter convenablement un système racinaire (Davet, 1996 ; Dommergues et Mangenot, 1970).

• **Pré-infection proprement dite :** Les rhizobia s'attachent à l'extrémité des poils racinaires par un mécanisme d'accrochage probablement dû à la présence de lectines (protéines agissant comme récepteurs) au niveau des racines qui interagiraient avec les polysaccharides de surface bactérienne compatibles. Ils sont impliqués dans l'attachement de cette bactérie aux racines de sa plante-hôte, ainsi il se produit une déformation caractéristique du poil absorbant appelée "curling" ou crosse de berger (recourbement des poils racinaires) (Dommergues et Mangenot, 1970).

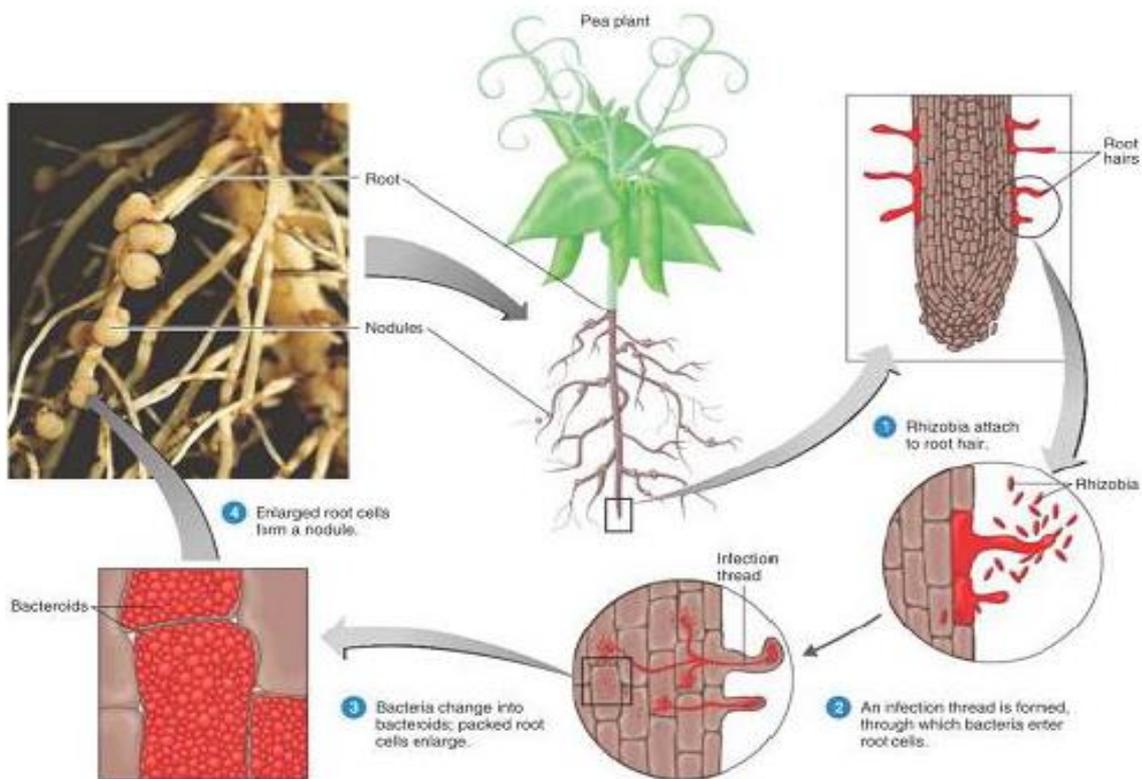


Figure 08 : Formation d'un nodule de racine dans une légumineuse infectée par Rhizobium (Tortora *et al.*, 2003).

III.2.2.2. Infection et la genèse du nodule

L'infection consiste en la pénétration des rhizobia en différents points du système racinaire, les bactéries emprisonnées à l'intérieur de la crosse vont alors pénétrer à l'intérieur du poil absorbant et donner naissance à une structure tubulaire, appelée filament ou cordon d'infection. Ce filament d'infection progresse à l'intérieur du poil absorbant, «guidé» par le noyau de la

cellule qui se déplace vers la base du poil, puis à travers le cortex de la racine. Simultanément, la présence de bactéries déclenche l'expression de gènes dont les produits (nodulines) provoquent la différenciation de certaines cellules du cortex interne, situées à proximité des filaments d'infection. Celles-ci se divisent activement et s'organisent en un méristème dont le fonctionnement est à l'origine de la formation du nodule. L'infection n'est de toute façon possible que pendant un délai relativement court, de l'ordre de huit à dix jours après la formation des racines. Celles-ci deviennent graduellement résistantes à cause d'une modification de la constitution chimique des parois cellulaires (**Duhoux et Nicole, 2004**).

III.2.2.3. Phase de maturation nodulaire ou phase intracellulaire

Cette phase est marquée par l'invasion des cellules tétraploïdes (situées dans la zone centrale du méristème nodulaire) par les bactéries libérées par la rupture des vésicules qui apparaissent sur les cordons d'infection. Ce mécanisme, identique à une endocytose, aboutit à la formation de cellules-hôtes très volumineuses contenant des bactéries entourées d'une enveloppe dérivée du plasmalemme de la cellule-hôte : la membrane pér bactéroïde (**Blondeau, 1980**). La composition de la membrane pér bactéroïdienne diffère de celle de la cellule-hôte. Elle permet des échanges entre la bactérie et le cytoplasme de la cellule-hôte. Elle assure à la bactérie une protection contre les mécanismes de défense que la plante pourrait mettre en œuvre pour lutter contre un envahisseur intracellulaire. Une fois libérées dans le cytoplasme de la cellule-hôte, les bactéries s'y multiplient une ou plusieurs fois avant de subir des changements morphologiques et se présenter en un aspect apparemment modifié auquel on a attribué le nom de bactéroïde (**Oke et Long, 1999**). Une nouvelle unité fonctionnelle est réalisée, le symbiosome, qui comprend le bactéroïde, l'espace pér bactéroïdien, et la membrane pér bactéroïdienne. Cette transformation en bactéroïdes s'accompagne d'une augmentation du taux d'ADN, d'un bouleversement métabolique, d'un arrêt des divisions qui est concomitant à la synthèse de la nitrogénase et la mise en route d'une assimilation de l'azote (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Quand la nodosité est bien formée elle comporte au centre, une région centrale totalement infectée, où les cellules de l'hôte sont gonflées, bourrées de bactéroïdes et contiennent en solution dans leur cytoplasme une molécule proche, par sa structure et sa fonction, de l'hémoglobine des vertébrés, de couleur brun rouge, la leghémoglobine (leg pour légumineuse). Ce pigment ne pénètre pas dans le cytoplasme des bactéries, il reste dissout dans le cytosol. C'est une caractéristique de l'activité des nodules. C'est une chromoprotéine appartenant à la famille des nodulines, qui assure le transport de l'oxygène vers les bactéroïdes et permet sa diffusion sous faible pression. Ce subterfuge permet le déroulement normal des

processus métaboliques, sans inactiver la nitrogénase (**Dommergues *et al.*, 1985**). La synthèse de la leghémoglobine résulte d'une coopération : l'information génétique pour la synthèse du groupement prosthétique (hème) se trouve dans l'ADN des bactéries et celle pour la synthèse de la partie protéique (globine) est contenue dans l'ADN des cellules-hôtes. En fournissant la partie protéique de la leghémoglobine, la plante semble se charger d'une part importante du travail. Elle peut collaborer aussi à la synthèse de l'hème dans la mesure où celle-ci est déficiente du côté bactéroïdien (**Lüttge *et al.*, 2002**).

III.2.2.4. Phase de dégénérescence

Durant cette phase, il y a un déclenchement des activités protéolytiques, la leghémoglobine se dégrade en biliprotéines, ce qui provoque le verdissement des nodosités qui dégènèrent. Les membranes des symbiosomes seront désagrégées, les bactéroïdes digérés par les cellules végétales, ces dernières libèrent les bactéries dans le sol, et la plante résorbe les produits résiduels (**Laberche, 2004**).

III.2.3. Agrobactéries

Les agrobactéries sont des bactéries naturellement présentes dans les sols. Elles appartiennent aux genres *Agrobacterium*, si elles acquièrent le plasmide Ti (*Tumor inducing*), elles peuvent devenir pathogènes, provoquant la Galle du Collet. Cette maladie se traduit par l'apparition d'une tumeur au niveau du collet de la plante, cette tumeur est provoquée par le transfert à la plante d'une portion d'ADN du plasmide Ti. Du fait de leur importance économique, ces bactéries ont été étudiées d'un point de vue phytopathologique et surtout elles ont beaucoup intéressé le domaine de la biotechnologie. En effet, le plasmide Ti, qui porte les gènes de virulence chez *Agrobacterium*, a permis la construction des plantes génétiquement modifiées consistant en l'insertion de gènes d'intérêt dans l'ADN du plasmide Ti pour être transféré au génome de la plante (**Conn, 1942 ; Valentine, 2003**).

III.2.3.1. Plasmide Ti et pathogénie

La galle du collet est liée à la présence dans les bactéries du plasmide Ti (**Figure 09**) (pour *Tumor inducing*, plasmide inducteur de tumeur). Les racines adventices surnuméraires sont liées à la présence du plasmide Ri (pour *Root Inducing*, plasmide inducteur de racines). Ces plasmides se disséminent dans la population bactérienne par transfert conjugatif. Les agrobactéries sont attirées par des composés phénoliques (comme l'acetosyringone) libérés par les cellules

végétales lorsqu'elles sont blessées. Au niveau de cette blessure, la bactérie transfère à la plante une portion du plasmide Ti qui va ensuite s'intégrer dans le génome nucléaire de la plante. Les gènes transférés à la plante induisent la biosynthèse par la plante des hormones de croissance, ce qui provoque la tumeur et la synthèse d'opines. Le plasmide Ti comporte aussi les gènes de catabolisme des opines. Ceux-ci ne sont pas transférés à la plante. Ce plasmide porte cinq types de gènes (Van Larebeke *et al.*, 1974 ; Chilton *et al.*, 1977 ; Genetello *et al.*, 1977 ; Zhu *et al.*, 2000).

- **Région T (ADN-T)** : il s'agit du segment transféré à la plante, cette région porte les gènes de production d'hormone végétale (auxine et cytokine) qui provoque la tumeur, et les gènes de production d'opines, qui seront utilisées comme source de carbone par les agrobactéries.

- **Région Vir** : ces gènes permettent le transfert de l'ADN-T vers la plante, ils sont communs aux différents types de plasmides Ti. Elle comporte 20 gènes essentiels à l'induction de tumeur chez l'hôte.

- **Locus *tra* et *trb*** : ces gènes sont impliqués dans le transfert conjugatif du plasmide.

- **Région Rep** : les trois gènes de cette région permettent une réplication stable du plasmide et sont impliqués dans les fonctions d'incompatibilité.

- **Acquisition et catabolisme des opines** : cette quarantaine de gènes permet aux agrobactéries d'utiliser les opines produites par la plante comme source de nutriments.



Figure 09 : Régions du plasmide Ti (Van Larebeke *et al.*, 1974).

III.2.3.2. Processus de colonisation

Le processus de colonisation de la tumeur est provoqué par le transfert de l'ADN-T de la bactérie vers la plante. Ce processus est dérivé d'un transfert conjugatif, les gènes qui régulent ce processus sont exprimés en réponse à des signaux chimiques libérés par l'hôte. Il se déroule en sept étapes (Petit *et al.*, 1970 ; Stachel *et al.*, 1985 ; Kado, 1991) :

- **Reconnaissance d'une cellule sensible** : les composés phénoliques (l'acetosyringone et l'acide sinapinique en particulier) excrétés par les cellules blessées attirent les agrobactéries.

- **Attachement de la bactérie à la cellule végétale** : quand la bactérie arrive sur la blessure, un faible attachement réversible a lieu. Puis la bactérie produit des fibrilles de cellulose qui vont l'ancrer fermement à la surface de l'hôte. Les gènes chromosomiques *chvA*, *chvB*, production et sécrétion de α -1,2- glucane, et *pscA* sont impliqués dans cet attachement essentiel à la pathogénie.

- **Induction de l'expression des gènes vir** : En présence de sucre, en pH acide, et sous l'action de l'acetosyringone végétale, la protéine VirA s'autophosphoryle et transfère son groupement phosphate à la protéine VirG. Ceci permet l'activation de tout l'opéron vir.

- **Production d'une copie transférable de l'ADN-T** : Il y a formation d'un complexe T stable. L'ADN-T est protégé par des protéines SSB (*Single Strain Binding*) VirE2 et porte à l'extrémité 5' une protéine VirD2 qui porte les séquences NLS (*Nuclear Localisation Signal*) d'adressage vers le noyau de la cellule végétale.

- **Transfert du complexe T à la cellule végétale** : Le système de transfert du complexe T est probablement dérivé d'un système conjugatif. Un pilus est créé entre la bactérie et la cellule végétale. Soit, ce pilus sert de canal et le complexe T passe dedans, soit il sert de crocher à rapprocher les deux cellules. La protéine VirD2 guide le complexe T vers le noyau de la cellule.

- **Intégration du complexe T dans le génome nucléaire de la plante** : L'ADN-T est intégré par recombinaison illégitime. Il semble s'intégrer au hasard dans le génome végétal. Il n'y a pas de prérequis dans la séquence végétale. Cependant, l'intégration est apparemment plus facile dans les zones de transcription active.

- **Expression des gènes portés par l'ADN-T** : Une fois intégré dans le génome, l'ADN-T se comporte comme un locus de plus (transgène) pour la plante transmis de façon mendélienne à la descendance. Le transgène est très exprimé car il comporte les signaux de la transcription eucaryotiques. Les hormones végétales produites par les tissus tumoraux

induisent la tumeur. Les opines secrétées par les tumeurs régulent positivement les gènes de leur catabolisme portées par le plasmide Ti des bactéries. Ces opines stimulent aussi la conjugaison bactérienne et l'expression des gènes de virulence.

III.2.4. Impact écologique des OGM

La transgénèse est une technique qui consiste à introduire dans un organisme un gène (ou un petit nombre de gènes) d'un autre organisme, quelle que soit l'origine de ces gènes (microorganisme, plante de la même espèce ou d'une autre espèce, animal ou être humain) et par une méthode autre que la reproduction sexuée. L'organisme obtenu est qualifié de génétiquement modifié (OGM) (Chevassus-au-Louis, 2001). Le processus de transgénèse implique l'ajout d'information au bagage génétique de l'organisme hôte et la traduction de cette information en produit recombinant souvent étranger, en général une protéine montrant une activité biologique spécifique. En théorie, l'ADN introduit et la protéine encodée par la nouvelle séquence nucléique peuvent ensuite circuler dans l'environnement et agir sur le milieu pour en influencer les composantes. Alors que le produit encodé par un transgène est généralement destiné à agir sur une cible précise, des effets parallèles ne peuvent être exclus. La migration de transgènes en direction de génomes apparentés ou une interférence métabolique sur un organisme auxiliaire en environnement sont des phénomènes possibles, tout comme une altération des caractéristiques intrinsèques du vivant modifiée pouvant montrer des effets éventuels aux niveaux trophiques supérieurs de l'écosystème. Techniquement, l'impact d'un OGM sur son milieu résultera de l'intégration stable du transgène au sein de son génome, de l'activité biologique de la protéine recombinante encodée par ce transgène, ou d'une combinaison des deux facteurs. Le transgène pourra montrer des effets (i) par sa présence nouvelle et soudaine dans le milieu (gain génétique) alors qu'il pourra être éventuellement intégré au génome d'autres organismes ; et (ii) par son lieu d'insertion dans le génome de l'hôte, qui pourra en altérer les caractères par un effet activateur ou répresseur sur l'expression de gènes situés à proximité ou physiquement disloqués par l'insertion de la nouvelle séquence (mutagénèse insertionnelle). La protéine recombinante pourra influencer le milieu (i) par son action (activité biologique) sur des organismes non ciblés a priori ; ou (ii) par une modification des caractéristiques de l'hôte causée par un effet d'interférence de la protéine recombinante sur ses fonctions métaboliques (effets pléiotropiques ou d'interférence). La **figure 10** indique les concepts définis à propos du devenir des transgènes dans le milieu, considérant en particulier leur intégration possible au bagage génétique d'espèces apparentées ou plus éloignées par des

phénomènes d'hybridation et de transfert génique horizontal (Chevassus-au-Louis, 2001 ; Michaud, 2005).

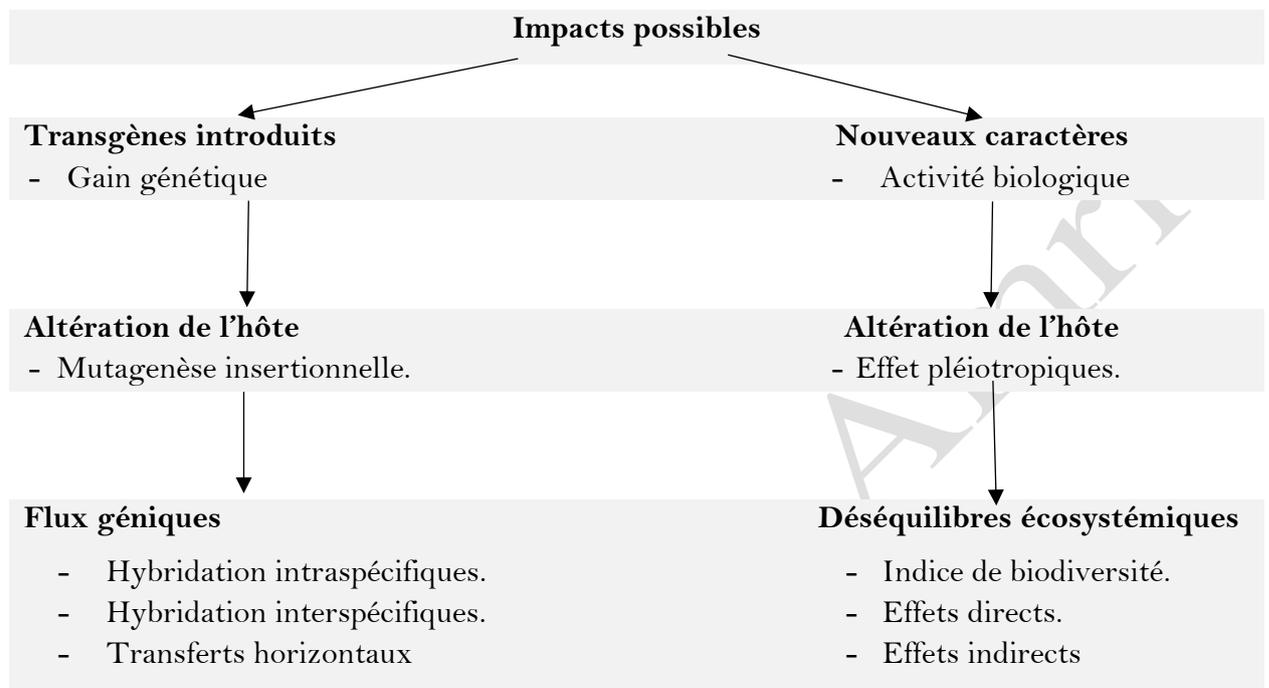


Figure 10 : Impacts écologiques attribués aux OGM (Michaud, 2005).

III.3. Interactions microorganismes / animal et animal

III.3.1. Flore microbienne normale

In utero, les animaux, y compris les humains sont généralement exempts de tout microbe, à la naissance des populations microbiennes normales et caractéristiques commencent à se développer dans l'organisme du nouveau-né. Immédiatement avant l'accouchement, les lactobacilles présents dans le vagin de la mère se multiplient rapidement. Les microorganismes avec lesquels le nouveau-né entre en contact sont généralement ces lactobacilles qui deviennent les principaux microorganismes présents dans l'intestin du nouveau-né. Le corps humain héberge quelque 10^4 cellules bactériennes, ces microorganismes qui habitent normalement l'organisme s'appelle : flore microbienne normale. Parmi ces microorganismes certaines sont présents en permanence : on parle alors de flore normale permanente. D'autres demeurent sur les tissus de façon temporaire (quelques jours, semaines ou mois) puis disparaissent, ils forment la flore transitoire. Cette flore est composée d'une part de

microorganisme qui appartiennent à la flore normale et qui ont migré vers autre région de l'organisme et d'autre part de microorganisme provenant de l'environnement extérieur. L'installation des microorganismes de la flore normale s'appelle colonisation, on trouve des microbes de la flore normale sur la totalité de la surface de la peau, toutes les muqueuses sont colonisées mais le territoire des microorganismes est limité aux régions proches des orifices naturels. Par exemple la colonisation de la muqueuse respiratoire diminue progressivement de la muqueuse nasale à la muqueuse bronchique, les alvéoles pulmonaires sont normalement exemptes de microbes. La muqueuse digestive est colonisée sur toute sa longueur, mais la flore est presque inexistante sur la muqueuse gastrique qui est très acidifiée (**Tortora et al., 2003 ; Willey et al., 2008**). Après développement, la flore normale procure des avantages à son hôte en prévenant la croissance des microorganismes nuisibles à sa santé, ce phénomène appelé antagonisme microbien ou effet barrière fait intervenir la compétition entre des microbes. La flore normale protège ainsi l'hôte contre l'implantation des microbes potentiellement pathogènes, elle entre en concurrence avec ces derniers pour les nutriments, elle produit des substances susceptibles de leur nuire et elle influe sur les conditions ambiantes, telles que le pH et la quantité d'oxygène disponible. Tout déséquilibre entre flore normale et les microorganismes pathogènes peut avoir pour conséquence l'apparition d'une maladie infectieuse. Par exemple la flore bactérienne normale du vagin d'une femme adulte maintient le pH des sécrétions vaginales entre 3,5 et 4,5 ; conditions qui limitent la croissance excessive de *Candida albicans*. Mais si la population bactérienne normale est réduite par l'ingestion d'antibiotiques ou si le pH des sécrétions vaginales est modifié en raison de l'usage abusif des douches vaginales, *Candida albicans* peut croître au point de constituer le principal microorganisme dans le vagin. On observe aussi l'antagonisme microbien dans la bouche, où des streptocoques produisent des composés qui inhibent la croissance de la majorité des cocci à Gram négatif ou à Gram positif. On le trouve également à l'œuvre dans le gros intestin, où les cellules d'*E.coli* produisent des bactériocines, ces protéines inhibent la croissance de diverses autres bactéries de la même espèce ou d'espèces apparentées, dont les agents pathogènes *Salmonella* et *Shigella*. La bactériocine produite par une bactérie donnée ne tue pas cette dernière, mais elle peut détruire d'autre bactérie (**Tortora et al., 2003 ; Prescott et al., 2010**).

La présence de l'espèce *Clostridium difficile* dans le gros intestin offre un autre exemple d'antagonisme bactérien, la flore normale du gros intestin inhibe cette espèce de manière efficace peut être en occupant les récepteurs cellulaires de l'hôte, en s'appropriant les nutriments disponibles ou en produisant des bactériocines. Cependant si la flore normale est réduite par des

antibiotiques. *Clostridium difficile* peut poser des problèmes, cette bactéries est responsable de presque toutes les infections gastro-intestinales consécutives à une thérapie aux antibiotiques, depuis la diarrhée légère jusqu'à des colites (inflammation du colon) graves et parfois même fatale. Le microbe envahit la paroi intestinale et libère des toxines qui provoquent la destruction de nombreuses cellules de la muqueuse intestinale et l'apparition d'une diarrhée, de la fièvre et de douleurs abdominale. Il est donc essentiel que la flore normale demeure stable pour jouer son rôle protecteur (Tortora *et al.*, 2003 ; Willey *et al.*, 2008).

III.3.2. Principale flore de l'Homme

Certaines régions du corps humain réunissent des conditions plus favorables à la croissance bactérienne que d'autre. Le **tableau 05** continent la liste des principaux microorganismes qui constituent la flore normale.

Tableau 05 : Flore normale de diverses parties du corps humain (Tortora *et al.*, 2003).

Partie du corps	Principaux microorganismes
Peau	<i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>Pityrosporum spp</i> , <i>Candida spp</i> .
Yeux	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .
Nez et pharynx	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus</i> et <i>Neisseria</i> .
Bouche et dents	Diverses espèces de <i>Staphylococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Treponema</i> non pathogène et <i>Candida</i> .
Jéjunum et iléum	Bactérioses et entérobactéries.
Gros intestin	<i>Streptococcus</i> groupe D, Bactérioses, <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i> et <i>Candida</i> .
Système urogénital	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> .

III.3.2.1. Peau

La peau est imperméable aux microorganismes et constitue de fait la première ligne de défense contre l'invasion. Bien que la surface de la peau soit en majorité sèche et inhospitalière, une microflore normale s'y développe et nécessite des éléments nutritifs. Les deux sources principales des nutriments sont les glandes sudoripares et les glandes sébacées. Les glandes sudoripares sont de deux types, les glandes exocrines qui génèrent la transpiration ; les glandes apocrines qui secrètent la sueur et des nutriments. Les glandes apocrines sont plus actives après la puberté. Elles secrètent du lysozyme, une enzyme qui hydrolyse le peptidoglycane de la paroi de la cellule bactérienne ; de même ils secrètent de l'acide lactique qui en maintient le pH entre 3 et 5. Les glandes sébacées sont associées aux follicules pileux, elles secrètent des composés lipidiques (sébum) qui permettent de contrôler le taux d'humidité et les changements brusques de température de l'épiderme. Le catabolisme des lipides du sébum par la flore propiogène résidente produit des acides gras tel que : acide oléique qui inhibe la prolifération d'autres espèces. La concentration relativement élevée de sébum, lipides, acides gras libres, alcools d'acides gras, glycérol et glucides produits par les glandes sébacées constituent des substances pour une flore microbienne d'environ 10^6 bactérie/cm². A l'inverse des zones humides de la peau comme les aisselles, le cuir chevelu et les pieds, des zones plus sèches comme la paume des mains qui contiennent peu ou pas de glandes sécrétoires, ont une densité microbienne moindre de l'ordre de 10^2 à 10^4 bactéries/cm² (Perry *et al.*, 2004).

III.3.2.2. Appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est composé par la bouche, le nasopharynx, la gorge, la trache, les bronches et les poumons, ces zones humides sont des sites potentiels de colonisation microbienne. La bouche est environnement favorable pour les bactéries en raison de sa relative richesse en nutriments et de la stabilité de sa température et de son pH. La salive contient près de 10^8 bactéries par millilitre. La plus part de ces microorganismes proviennent de colonies qui adhèrent à la surface de la langue, des gencives et des dents. La production constante de salive et la déglutition décrochent les bactéries qui n'ont pas adhéré aux surfaces. Les lysozymes et lactopéroxydase salivaires inhibent la croissance bactérienne. La salive contient environ 0,5 % de substances solubles constituées de protéines comme les enzymes salivaires et des mucoprotéines. *Streptococcus salivarius* prolifère en adhérant à la surface de la langue. Les dents composées de matière minérale à base de phosphate de calcium sont facilement colonisées. En raison de leur taux d'humidité, le nasopharynx et le nez sont inoculés en permanence par des

microorganismes lors de la respiration, la flore microbienne des narines est similaire à celle de la peau du visage avec une prédominance d'espèces du genre *Staphylococcus* et d'autres bactéries à Gram positives. Chez un individu sain, l'appareil respiratoire inférieur qui comprend la trachée, les bronches et les poumons est normalement stérile. La plupart des poussières et des autres particules qui sont inhalées se fixent sur les membranes à mucus de l'appareil respiratoire inférieur sont éliminées par les cellules ciliées de la muqueuse. Le mucus qui recouvre cette zone capte les particules et le mouvement ascendant provoqué par les cils entraîne le mucus vers le haut jusqu'à la gorge où il est avalé par un réflexe de déglutition (Meyer *et al.*, 2004 ; Willey *et al.*, 2008 ; Prescott *et al.*, 2010).

III.3.2.3. Appareil digestif

- **L'estomac** : il est inoculé en permanence par des bactéries apportées par la salive et le mucus dégluti ou par les aliments ingérés. Peu d'entre elles survivent ; moins de 10 bactéries sont dénombrées par fluide stomacal. Le faible pH dû à la présence d'HCL et les enzymes digestives détruisent la plus grande partie des microorganismes qui atteignent l'estomac. Certains lactobacilles acidotolérants et des levures parviennent à y survivre. Dans certaines circonstances, l'estomac humain peut être colonisé par *Helicobacter pylori*, une bactérie microaérophile responsable du développement d'ulcère (Perry *et al.*, 2004).

- **L'intestin grêle** : il est anatomiquement divisé en 3 sections, la partie supérieure constitue le duodénum, la section centrale le jéjunum, et la partie inférieure l'iléum. Au cours de la digestion, le nombre de bactérie augmente au fur et à mesure que les aliments progressent dans l'intestin grêle. Le duodénum compte une population bactérienne faible (moins 10^3 bactérie/ml) en raison de l'acidité de l'estomac, de la bile sécrétée par la vésicule biliaire et des sécrétions pancréatiques. La microflore est essentiellement composée de coques et de bacilles à Gram positifs. La flore du jéjunum est composée d'entérocoques, de lactobacilles et de corynébactéries. La levure *Candida albicans* est un hôte fréquent de cette zone. La nature de la flore de l'iléum est très proche de celle du gros intestin avec une prédominance d'espèce du genre *Bacteroides* et un nombre plus restreint de bactéries anaérobies facultatives comme *Escherichia coli* (Meyer *et al.*, 2004).

- **Le gros intestin** ou colon, fonctionne comme une cuve de fermentation peuplée de bactéries anaérobies. Les aliments ingérés constituent les substrats de base pour ces organismes. La densité de ces bactéries dans cette région oscille entre 10^{10} et 10^{11} cellules par gramme et plus de 350 espèces différentes y ont été identifiées. Le nombre de bactéries anaérobies est

plusieurs centaines de fois supérieures à celui des germes aérobies facultatives. Aucun organisme aérobie strict n'y présente. Un adulte excrète 3×10^{13} bactéries par jours ce qui représente 25 à 35 % de la masse des matières fécales. Différentes vitamines indispensables à l'homme, parmi lesquelles la vitamine B12, la biotine, la riboflavine et la vitamine K, sont apportées par la flore microbienne de l'appareil digestif. La microflore du colon d'un adulte sain est composée de bactéries à Gram positives et négatifs. Stérile à la naissance, les intestins du nouveau-né est rapidement colonisé par des bactéries, si le nourissant est allaité, la flore sera principalement constituée par des bactéries du genre *Bifidobacterium* provenant de la peau de la mère. Le lait maternel contient un disaccharide indispensable à cette bactérie. Pour ceux nourris aux biberons, la flore du colon est complexe et principalement composée d'espèce du genre *Lactobacillus*. Le passage à une alimentation solide entraîne chez l'enfant un changement progressif de la flore intestinale qui conduit à celle des adultes (Perry *et al.*, 2004).

III.3.2.4. Appareil uro-génital

Le rein, l'urètre et la vessie d'un adulte sain sont normalement stérile, la stérilité est assurée par le nettoyage mécanique et une possible activité antibactérienne issue de la muqueuse urétrale. La partie inférieure de l'urètre aussi bien de l'homme que de la femme est colonisée par des bactéries. L'appareil urogénital de la femme adulte contient une flore microbienne complexe. A l'âge adulte, le vagin est colonisé par des lactobacilles acido-tolérants qui convertissent le glycogène produit par l'épithélium vaginal en acide lactique. Cette transformation assure le maintien du pH entre 4,4 et 4,6. Les bactéries lactiques, les entérobactéries, les bactéries corynéformes, la levure *Candida albicans* et diverses bactéries anaérobies qui supportent ces pH sont généralement présentés (Meyer *et al.*, 2004).

III.3.3. Bases du pouvoir pathogène

Malgré les barrières naturelles, les différentes défenses non spécifique, les microorganismes parviennent à envahir l'hôte et à provoquer une maladie. Les abrasions ou les coupures qui affaiblissent nos barrières naturelles sont de véritables portes d'entrée pour les microorganismes pathogènes qui vont pouvoir initier un processus infectieux. Les bactéries pathogènes ont la capacité de se fixer spécifiquement à certains épithéliums ou membranes et de produire des toxines qui vont altérer les cellules hôte. L'infection est inévitable si le pathogène atteint un site spécifique et parvient à le coloniser. (Perry *et al.*, 2004). Les microorganismes infectieux sont de trois types, les pathogènes obligatoires, accidentels ou opportunistes. Un pathogène obligatoire est un organisme comme *Neisseria gonorrhoeae* ou

Streptococcus pyogenes qui ne peut survivre en dehors de son hôte. La survie du pathogène dépend de sa capacité à changer d'hôte, à adhérer et à coloniser un nouveau hôte. Un pathogène accidentel est un microorganisme tel que *Clostridium tetani*, qui est ubiquitaire dans la nature et n'est responsable d'une maladie que dans des circonstances particulières. Cet organisme provoque le tétanos dont l'issue peut être fatale si le microorganisme pénètre accidentellement dans l'organisme à la faveur d'une plaie profonde. Un microorganisme opportuniste n'infecte pas les individus sains mais provoque une maladie chez des sujets déjà atteints ou affaiblis. Par exemple les malades atteints de SIDA sont plus sensibles à la tuberculose et à d'autres maladies que ne le sont les sujets sains (Perry *et al.*, 2004 ; Prescott *et al.*, 2010).

III.3.3.1. Virulence

La virulence traduit la capacité d'un pathogène à provoquer une maladie, il existe divers facteurs de virulence incluant l'aptitude à la fixation du fer, les variations de phase et les facteurs plasmidiques. Un organisme hautement virulent provoquera une infection aiguë dès lors qu'il trouvera un terrain favorable. Les organismes les plus virulents sont très invasifs, certains organisme peu invasifs sont néanmoins pathogènes en raison d'une production de toxine. *Streptococcus pneumoniae* est très invasif mais ne produit pas de véritable toxine. *Clostridium tetani* et *Clostridium botulinum* n'ont quasiment pas de faculté d'invasion mais produisent de puissantes toxines. L'inoculation de *C.tetani* par piqûre peut être mortelle, alors que l'ingestion de la toxine de *C.botulinum* même en faible quantité peut être fatale. Le fer est indispensable pour la synthèse des cytochromes qui assurent le transport des électrons dans les processus de production d'énergie. Les vertébrés fixent le fer réduit dans leur organisme sous forme soluble grâce à des glycoprotéines de haute affinité comme la lactoferrine du lait, des larmes, de la salive du mucus et des lipides intestinaux ou la transferrine du plasma. La concentration en fer libre dans les liquides biologiques est inférieure à 10^{-8} M. A l'exception des bactéries invasives, toutes celles qui dépendent du fer, doivent l'obtenir par le biais de la lactoferrine ou de transferrine de l'hôte afin de pouvoir se multiplier. A cette fin, de nombreux pathogènes synthétisent des sidérophores de bas poids moléculaire qui ont une affinité pour le fer supérieure à celle de la lactoferrine et de la transferrine de l'hôte. Les sidérophores sont des récepteurs localisés dans la membrane cytoplasmique des agents pathogènes. Ils transfèrent vers la bactérie colonisatrice, le fer décroché des glycoprotéines de l'hôte. **Exemple :** L'entérobactine est un siderophore caractéristique produit par *E.coli*. C'est un dérivé du catéchol qui chélate le fer par le biais des atomes d'oxygène du noyau catéchol. Les organismes sécrètent des sidérophores lorsque le milieu de culture est pauvre en fer, ce qui leur permet de capter cet élément. Le complexe

sidérophore-fer se fixe sur un récepteur membranaire spécifique de l'enveloppe cellulaire et le fer est transféré à travers la membrane cytoplasmique par des protéines de transport spécifique. Un autre facteur de virulence est le changement de phase. Les fimbriae bactériennes sont des antigènes efficaces et des anticorps de l'hôte ciblent souvent les protéines des fimbriae des pathogènes invasifs. Les fimbriae sont des inducteurs primaires d'anticorps en raison de leur localisation à la surface des cellules microbiennes, ils ont un rôle dans l'adhésion aux muqueuses de l'hôte a été évoqué plus haut. Le chromosome de certaines pathogènes contient un gène pour la synthèse des fimbriae dont l'expression est constitutive. D'autres gènes non exprimés de fimbriae, codant des séquences d'acides aminés différentes, sont présents dans différents sites du chromosome bactérien. Une recombinaison entre ces gènes peut provoquer des changements mineurs ou drastiques dans la structure des fimbriae. Les fimbriae produits alors ne sont pas reconnus par les anticorps dirigés contre la structure protéique du fimbriae original. Une bactérie pathogène équipée de ce type de fimbriae modifié aura un avantage sur les défenses de l'hôte (Nauciel et Vildé, 2007 ; Prescott *et al.*, 2010).

Les facteurs de virulence peuvent être codés par les plasmides des agents pathogènes. Dans ce cas, le passage de l'information génétique d'un nombre limité de microorganisme pathogènes virulents vers une population d'agents moins virulents est rapide. Lors d'une infection, les organismes qui possèdent des facteurs de virulence plasmidique comme un gène de résistance à un antibiotique survivront. De plus, ils pourront transmettre l'information génétique à d'autres membres de la colonie, augmentant ainsi la résistance à l'antibiotique dans une large proportion de la population microbienne (Perry *et al.*, 2004 ; Willey *et al.*, 2008). Le tableau 06 représente quelques facteurs de virulence à déterminisme plasmidique.

Tableau 06 : Facteurs de virulence portés par les plasmides (Perry *et al.*, 2004).

Organismes	Facteurs	Maladies
<i>Escherichia coli</i>	Entérotoxine	Diarrhé
<i>Clostridium tetani</i>	Neurotoxine	Tétanos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coagulase, entérotoxine	Furoncles, infection cutanées, intoxication alimentaire.
<i>Streptococcus mutans</i>	Dextrane sucrase	Caries dentaire
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tumeur	Galle du collet
<i>Staphylococcus spp</i>	Résistance aux antibiotiques	Variées.

Les organismes infectieux ont rarement la capacité de pénétrer la peau saine, les muqueuses ou les épithéliums de surfaces. Ils utilisent préférentiellement des facteurs d'adhésion qui leur permettent de se fixer à un tissu spécifique, de le coloniser et d'initier un processus infectieux. Des bactéries sont néanmoins capables de provoquer des maladies sans qu'une fixation spécifique soit nécessaire. Des microlésions sur la peau ou les muqueuses peuvent permettre l'infection par *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* alors qu'ils font partie de la flore normale de ces sites. Les organismes peuvent également infecter les plaies ou les zones de brûlures par transmission passives via des particules de poussières de l'air ou des aérosols d'eau. La plupart des infections aiguës ont comme point d'entrée la muqueuse respiratoire, gastro-intestinale ou urogénitale. La capacité du pathogène à déclencher l'infection dépend pour une grande partie de sa fixation sur des cellules spécifiques. Les organismes qui infectent les surfaces disposent le plus souvent de facteurs qui favorisent ce processus. Ces facteurs d'adhésion sont assez spécifiques et n'interagissent pas au hasard avec les cellules épithéliales (**Tableau 07**). Ceux qui permettent la fixation aux cellules de la gorge ne permettront probablement pas l'adhésion à l'épithélium intestinal et inversement. Un agent pathogène responsable de l'infection d'un site spécifique de l'organisme est équipé de fimbriae ou d'autres facteurs de surface impliqués dans les phases de fixation. Les fimbriae présents sur les souches diffèrent en fonction des tissus qu'elles infectent. Par exemple, *Escherichia coli* produisent des fimbriae avec différents lectines spécifiques qui influencent l'adhérence des bactéries aux différents tissus de l'hôte et définissent le type d'infection. Les souches *E.coli* pathogène responsable d'infections urinaires chez l'Homme possèdent des fimbriae de type P (pyélonéphritique) alors que les fimbriae de type S sont produits par les souches d'*E.coli* à l'origine d'infection intestinale chez les nourrissons. Des modifications génétiques qui empêchent la synthèse des fimbriae spécifiques entraînent une perte de la virulence des organismes. Les souches dépourvues de facteurs d'adhésion (fimbriae) ne sont pas pathogène, ils sont éliminés par les mouvements des cellules ciliées ou entraînés par les liquides biologiques (**Meyer et al., 2004 ; Perry et al., 2004**).

Tableau 07 : Facteurs d'adhésions bactériens impliquées à l'attachement à la cellule hôte (**Perry et al., 2004**).

Facteurs d'adhésion	Exemples
Fimbriae (protéine d'adhésion)	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Acide teichoïque et lipoteichoïque	<i>Staphylococcus aureus</i> .

Les pathogènes restent souvent focalisés à la surface des muqueuses où ils se multiplient et où ils provoquent des dommages liés à la production de substances toxiques. Des maladies comme la coqueluche (*Bordetella pertussis*), la diphtérie (*Corynebacterium diphtheriae*) et le choléra (*Vibrio cholerae*) en sont des exemples. D'autres microorganismes sont responsables d'infections parce qu'ils pénètrent à l'intérieur des épithéliums et se multiplient sous la muqueuses ou encore parce qu'ils sont transportés par le système lymphatique ou le sang vers d'autres zones de l'organisme, c'est le cas de *Neisseria meningitidis* (Perry *et al.*, 2004 ; Willey *et al.*, 2008). Pour déclencher un processus infectieux, un agent pathogène doit être capable de se multiplier chez l'hôte. Si un microorganisme peut envahir mais ne peut se multiplier, il ne sera pas capable de déborder les défenses naturelles de l'hôte. La colonisation ne peut pas se faire sans source de nutriments solubles comme les sucres, les acides aminés et les acides gras. Quelques sels minéraux sont également indispensables. En l'absence de ces composés dans l'espace extracellulaire, l'invasion des cellules de l'hôte est un pré-requis pour la nutrition et la croissance du pathogène (Prescott *et al.*, 2010). La destruction des cellules de l'hôte peut être liée à la présence d'enzymes fonctionnelles produites par la bactérie pathogène. Certaines enzymes produites par des agents pathogènes sont représentés dans le **tableau 08**. La collagénase, elastase, hyaluronidase et la lécithinase dissocient les cellules de l'hôte en hydrolysant le collagène, ciment intercellulaire, ou en détruisant la phosphatidylcholine qui est un élément de la membrane cytoplasmique. Ces enzymes perforent la cellule de l'hôte, libérant les composés solubles au profit de l'agent pathogène. La coagulase produit par *Staphylococcus aureus* favorise la formation de caillots qui tapissent le site d'infection, empêchant l'action des phagocytes. *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* synthétisent également une streptokinase qui facilite la progression des pathogènes dans les tissus en détruisant les caillots (Perry *et al.*, 2004).

Tableau 08 : Enzymes bactériennes facilitant l'invasion de l'hôte (Perry *et al.*, 2004).

Enzymes	Organismes	Fonctions
Collagénase	<i>Clostridia</i>	Dégradation du collagène des tissus conjonctifs.
Coagulase	<i>Staphylococcus aureus</i>	Protection contre les défenses de l'hôte par la formation de caillot.
Elastase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dissociation des membranes.
Hyaluronidase	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Clostridium</i>	Hydrolyse de l'acide hyaluronique et du ciment intercellulaire.
Lécithinase	<i>Clostridium</i>	Dégradation de la phosphatidylcholine membranaire.
Streptokinase	<i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Digestion de la fibrine des caillots.

III.3.3.3. Notion de réservoirs naturels

La notion de réservoir est le lieu dans lequel s'accumulent et prolifèrent les agents biologiques. Ces derniers pouvant croître partout, les réservoirs peuvent se trouver dans l'environnement : le sol, les eaux douces ou marines, les plantes mais également sur ou dans un être humain ou un animal [3]. Par définition, pour chaque agent pathogène biologique, il existe ce que l'on appelle un réservoir car, sinon, cet agent pathogène aurait disparu (en tant qu'espèce). Il peut s'agir du milieu ambiant (réservoir hydro-tellurique), d'une population monospécifique (une seule espèce réservoir) ou d'un complexe d'espèces en interaction au sein d'un écosystème. Dans ce dernier cas, la perpétuation de l'agent pathogène peut être dépendante de l'intervention combinée de deux espèces (exemple : le phacochère et un ornithodore pour la peste porcine africaine) ou assurée par deux (ou davantage) réservoirs capables chacun de jouer isolément ce rôle (exemple : les bovins et des espèces sauvages pour la tuberculose à *Mycobacterium bovis*). La conservation est assurée soit par la survie de l'agent pathogène pendant de longues périodes (exemple : spores de *Bacillus anthracis* dans le sol), soit par sa multiplication au sein d'hôtes successifs, dans des conditions permettant sa transmission. Pour une même espèce d'agent pathogène biologique, il peut exister des réservoirs différents selon les conditions du milieu, dans la même région ou dans des régions différentes. Ainsi, pour l'espèce virus rabique, il existe dans le monde différentes espèces animales qui, selon les régions, jouent le rôle de réservoir : chien (Afrique, Asie), renard roux (*Vulpes vulpes*) (est de l'Europe), vampire roux (*Desmodus rotundus*) (Amérique centrale et du sud), petite mangouste indienne (*Herpestes auropunctatus*) (Caraïbes).... Pour la tuberculose bovine (*Mycobacterium bovis*), l'espèce réservoir universelle est l'espèce bovine. Dans certaines régions, d'autres espèces peuvent jouer le rôle de réservoir : le possum ou phalanger renard (*Trichosurus vulpecula*) en Nouvelle-Zélande, le cerf à queue blanche (*Odocoileus virginianus*) au Michigan (Etats-Unis), le buffle africain (*Syncerus caffer*) en Australie et le blaireau européen (*Meles meles*) en Angleterre et en Irlande.... Enfin, certaines espèces animales ne peuvent jouer un rôle de réservoir pour cet agent pathogène que si leur densité de population est très élevée : le daim rouge (*Cervus elaphus*), le grand koudou (*Tragelaphus strepsiceros*), le phacochère (*Phacochoerus aethiopicus*) et le putois (*Mustela putorius*).

Pour un agent biologique pathogène pour une seule espèce hôte, la fonction de réservoir est assurée par une circulation au sein de cette espèce. Dans ces conditions, des actions prophylactiques généralisées peuvent conduire à une éradication de la maladie (exemple : la variole humaine). Pour des maladies touchant des espèces domestiques et plusieurs espèces

sauvages (complexes à hôtes sauvages multiples comme la tuberculose à *Mycobacterium bovis*), il peut être difficile de connaître la nature exacte du rôle joué par chacune des espèces sauvages dans la circulation et la conservation de l'agent pathogène : réservoir vrai ou espèce dont l'infection dépend de la présence d'un réservoir. Certains auteurs qualifient de réservoir secondaire une espèce qui, dans une région donnée, ne peut assurer la conservation d'un agent pathogène que dans la mesure où elle co-existe avec un réservoir vrai (qualifié par ces auteurs de réservoir primaire). Pour des maladies à hôtes multiples, la fonction de réservoir résulte des valeurs (souvent inconnues ou difficiles à déterminer) des taux de reproduction de base (R_0) intra-espèce et inter-espèces des espèces impliquées. L'une des espèces peut, à elle seule, assurer cette fonction (le phalanger renard pour la tuberculose à *Mycobacterium bovis* en Nouvelle-Zélande), d'autres espèces y contribuant par une diffusion dans l'espace (le porc sauvage dans cet exemple) ou une conservation dans le temps (le cerf dans cet exemple). Dans ce genre de situation complexe, le rôle de chaque espèce peut évoluer au cours du temps et on peut penser qu'à certaines périodes, aucune espèce à elle seule n'assure la fonction de réservoir mais que celle-ci résulte du cumul des différents R_0 (intra et inter-espèces) des espèces atteintes [4].

Dr. Sandra Amiri

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Achtnich, C., Bak, F., Conrad, R., 1995.** Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol. Fert. Soils.* 19 : 65-72.
- Aelion C.M., Swindoll C.M., Pfaender K., 1987.** Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2212-2217.
- Alexander, M., 1981.** Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Sci.* 211 : 132-138.
- Atkinson, S., Chang, C.Y., Sockett, R.E., Càmara, M., Williams, P., 2006.** Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming mobility. *J. Bacteriol.* 188 : 1451 - 1461.
- Atkinson, S., Williams, P., 2009.** Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface.* 6 : 959-978.
- Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., 2008.** Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature structure in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 10 : 2331 -2343.
- Bayles, K.W., 2007.** The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* 5 : 721 – 726.
- Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2006.** *Ecology : From Individuals to Ecosystems.* fourth edition : Blackwell Publishing. Carlton. p.650.
- Bellon-Fontaine, M.N., Rault, J., van Oss, C.J., 1996.** Microbial adhesion to solvents : a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B.*, 7 : 47 - 53.
- Benmoussa, M., 1995.** *Ecologie des communautés périphtiques. Etude en laboratoire et en milieu naturel des conditions de développement et des caractéristiques de fonctionnement de trois types de biodermes.* Thèse de Doctorat en Hydrobiologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, p.207.
- Beumer, R.R., de Vries, J., Rombouts, F.M., 1992.** *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *International Journal of Food Microbiology.* 15 : 153-163.
- Bidaud, C., 1998.** *Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué.* Thèse de doctorat. Option : Génie des Procédés.p.279. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00841329>
- Biggs, B.J.F., 1990.** Use of relative specific growth rates of periphytic diatoms to assess enrichment of a stream. *New Zealand J. Mar. Fres. Res.* 24 : 9-18.
- Biggs, B.J.F., Close, M.E., 1989.** "Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers : the relative effects of flow and nutrients. *Fres. Biol.* 22 : 209-231.
- Bishop, P.L., 1997.** Biofilm structure and kinetics. *Water Sci. Tech.* 36 : 287-294.
- Blondeau, R., 1980.** *Fixation biologique de l'azote atmosphérique.* Librairie Vuibert, Paris : p.579.
- Boles, B.R., Singh, P.K., 2008.** Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 105 : 12503-12508.

Références bibliographiques

- Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K., 2004.** Self-generated diversity produces « insurance effets » in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 : 16630 – 16635.
- Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K., 2005.** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* 57 : 1210 – 1223.
- Boles., B.R., Horswill, A.R., 2008.** Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* DOI : 10.1371/journal.ppat.1000052.
- Bollag, J.M., Loll, M.J., 1983.** Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Exper.* 39 : 1221-1231.
- Borchardt, M.A., 1996.** Nutrients. In : *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems.* Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds), San Diego, Academic Press, pp. 183-227.
- Boyer, R.R., Sumner, S.S., Williams, R.C., Pierson, M.D., Popham, D.L., Kniel, K.E., 2007.** Influence of curli expression by *Escherichia coli* O157 : H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge and ability to attach to lettuce. *J. Food. Prot.* 70 : 1339-1345.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R., 2005.** Biofilms : the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13 : 20-26.
- Bronstein, J.L., 2015.** Mutualism. Oxford University Press. Disponible In : <https://www.zoom-nature.fr>. Consulté le : 06/09/2019.
- Buchanan, R.E., 1918.** Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98 :1271-1273.
- Buchanan, R.L., Cygnarowicz, M.L., 1990.** A mathematical approach toward defining and calculating on the duration of the lag phase. *Food Microbiol.* 7 : 237-240.
- Calvet, R., 2003.** *Le Sol. Propriétés et fonctions - Tome 1.* France Agricole, Paris. 455 p.
- Characklis, W.G., 1973.** Attached microbial growth I. Attachment and growth. *Water Res.* 7 : 1113 - 1127.
- Chevassus-au-Louis, B., 2001.** Rapport du groupe : OGM et agriculture (options pour l'action publique).p.393. Disponible sur : <https://www.vie-publique.fr>. Consulté sur : 10/02/2020.
- Chidthaisong, A., Conrad, R., 2000.** Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31 : 73-86.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M.P., Nester, E.W., 1977.** Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells : the molecular basis of Crown Gall tumorigenesis. *Cell.* 11 : 263-267.
- Colwell, R. R., 2000.** Viable but nonculturable bacteria : a survival strategy. *J. Infect. Chemother.*, 6 :121-125.
- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., Palmer, L. M., 1985.** Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : Implications for the release of genetically engineered microorganisms. *Biol. Tech.* 3 : 817-820.
- Combes, C., 2001.** *Les Associations du Vivant : L'art d'être parasite.* Edition Flammarion, Paris.p.236.

Références bibliographiques

- Comeau, Y., Greer, C.W., Samson, R., 1993.** Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 : 681-687.
- Conn, H.J., 1942.** Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bact.* 44 : 353-360.
- Cunliffe, D. A., 1990.** Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine. *J. Appl. Bacteriol.* 68 : 453-459.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2004.** Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28 : 261- 289.
- Das, T., Sharma, P.K., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., Krom, B.P., 2010.** Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *App. Environ. Microbiol.* 76 : 3405 - 3408.
- Dassonville, F., Renault, P., Valles, V., 2004.** A model describing the interactions between anaerobic microbiology and geochemistry in a soil amended with glucose and nitrate. *Eur. J. Soil Sci.* 55 : 29-45.
- Davet, P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA éditions, Paris.p.445.
- Day, A.P., Oliver, J.D., 2004.** Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *J. Microbiol.* 42: 69-73.
- Dhar, N., McKinney, J.D., 2007.** Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* 10 : 30 -38.
- Diels, L., Van Roy, S., Taghavi, S., Van Houdt, R., 2009.** From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*. *Anto. Van Leeuwenhoek.* 96 : 247 - 258.
- Doberva, M., 2016.** Le quorum sensing bactérien dans l'environnement marin : diversité moléculaire et génétique des auto-inducteurs. Thèse de doctorat en écologie microbienne. Université Pierre et Marie Curie France. p.315. Disponible sur : www.archives-ouvertes.fr.
- Dodds, W.K., Smith, V.H., Lohman, K., 2002.** Nitrogen and phosphorus relationships to benthic algal biomass in temperate streams. *Canadian J. Fish. Aqua. Sci.* 59 : 865-874.
- Dommergues, Y., Dreyfus, B., Diem, H.G., Duhoux, E., 1985.** Fixation de l'azote et agriculture tropicale. *Rec.* 16 : 22-31.
- Dommergues, Y., Mangenot, F., 1970.** Ecologie microbienne du sol. Edition Masson.p.350.
- Donlan, R.M., 2002.** Biofilms : microbial life on surface. *Emerg. Infect. Dis.* 8 : 881 - 890.
- Drenkard, E., 2003.** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5 : 1213 - 1219.
- Duhoux, E., Nicole, M., 2004.** Biologie végétale. Association et interaction. 2^{ème} Edition. Paris. p.628.
- Dukan, S., Piriou, P., Levi, Y., 1995.** Modélisation du développement des biomasses bactériennes libres et fixées en réseaux de distribution d'eau potable. In : Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage - Désinfection. Bellon-Fontaine, M.N., Fourniat, J., (Eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 149-160.
- Elifantz, H., Horn, G., Ayon, M., Cohen, Y., Minz, D., 2013.** *Rhodobacteraceae* are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 85 : 348 - 357.

Références bibliographiques

- Engebrecht, J., Neilson, K., Silverman, M., 1983.** Bacterial bioluminescence : isolation and genetic of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.*, 32 : 773-778.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hazan, R., 2006.** Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet.*, 2 : 135-145.
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., Denny, T.P., 1997.** Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology.* 26 : 251-259.
- Flavier, A.B., Ganova-Raeva, L.M., Schell, M.A., Denny, T.P., 1997.** Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.*, 179 : 7089 – 7097.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010.** The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8 : 623-633.
- Frontier, S., Pichod-Viale, D., 1990.** Ecosystèmes : Structure, Fonctionnement et Evolution. 2^{ème} Edition, 3^{ème} tirage. Dunod.p.447.
- Fuqua, C., Greenberg, E.P., 2002.** Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3 : 685 - 695.
- Galloway, W.R., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., Spring, D. R., 2011.** Quorum sensing in Gram-negative bacteria : small-molecule modulation of AHL and Al-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.* 111 : 28-67.
- García, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., Abu Kwaik, Y., 2007.** Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Enviro. Microbiol.* 9: 1267-1277.
- Garry, P., Andersen, T., Vendevre, J.L., Bellon-Fontaine, M.N., 1995.** Influence de la rugosité de surfaces en polyuréthane sur l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. In : Adhésion des microorganismes aux surfaces. Biofilms - Nettoyage – Désinfection. Bellon-Fontaine, M.N., Fourniat, J., (Eds), Paris, Lavoisier Tec & Doc, pp. 21-30.
- Gauthier, M. J., 2000.** Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. In : Nonculturable microorganisms in the environment. Colwell, R.R., Grimes, D.J., (Eds), ASM Press ; Washington, DC, 87-112.
- Genetello, C., Van Larebeke, N., Holsters, M., De Picker, A., Van Montagu, M., Schell, J., 1977.** Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* as conjugative plasmids. *Nature.* 265 :561-563.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2005.** Characterization of starvation –induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Envirn. Microbiol.*, 7 : 894-906.
- Gottschalk G., Knackmuss H.J., 1993.** Bacteria and the biodegradation of chemicals achieved naturally, by combination or by construction. *Angewandte Chemie International Edition in English* .32 : 1398-1408.
- Goulter, RM., Gentle, I.R., Dykes, G.A., 2009.** Issues in determining factors influencing bacterial attachment : a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49 : 1 -7.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knochel, S., Molin, S., 2010.** Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 : 2271 -2279.

Références bibliographiques

- Harrison, J.J., Ceri, H., Turner, R.J., 2007.** Mutimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat.Rev. Microbiol.*, 5 : 928 – 938.
- Harrison, J.J., Ceri, H., Turner, R.J., 2007.** Mutimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat.Rev. Microbiol.* 5 : 928 – 938.
- Harshey, R.M., 2003.** Bacterial motility on a surface : many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47 : 249 - 273.
- Heller, R., Holler, C., Sussmuth, R., Gundermann, K. O., 1998.** Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26 : 64-68.
- Hengge, R., 2009.** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat.Rev. Microbiol.*, 7 : 263 : 273.
- Hmelo, L.R., Mincer, T.J., VanMooy, B.A., 2011.** Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environ. Microbiol. Rep.* 3:682– 688.
- Høiby, N., Ciofu, O., Bjarnsholt, T., 2010.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.*, 5 : 1663-1674.
- Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A., Stewart, P.S., 2004.** Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm. *App. Environ. Microbiol.*, 70 : 7418-7425.
- Hussong, D., Colwell, R. R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A. D., Weiner, R. M., Burge, W. D., 1987.** Viable *Legionella pneumophila* not detected by culture on agar media. *Bio.Tech.* 5 : 947-950.
- Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E., Romeo, T., 2002.** Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 184 : 290 – 301.
- Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W.J., 2012.** The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. DOI : 10.1128/MMBR.05007-11.
- Jitackorn, S., Sadowsky, M.J., 2008.** Nodulation Gene Regulation and Quorum Sensing Control Density-Dependent Suppression and Restriction of Nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum*-Soybean Symbiosis. *Plant Microbiology*. DOI : 10.1128/AEM.02939-07.
- Jones, H.C., Roth, I.L., Sanders, W.M., 1973.** Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *J. Bacterio.* 99 : 316-325.
- Kado C.I., 1991.** Molecular mechanisms of Crown Gall tumorigenesis. *Critical Reviews in Plant Sci.* 10 : 1-32.
- Karatan, E., Watnich, P., 2009.** Signals, regulation networks and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Rev.*, 73 : 310 – 347 .
- Karatan, E., Watnich, P., 2009.** Signals, regulation networks and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Rev.*, 73 : 310 – 347 .
- Kell, D.B., 1988.** Protonmotive energy-transducing systems : some physical principles and experimental approaches. *In : Bacterial Energy Transduction*. Edited by CJ Anthony. London. pp. 429 - 490.

Références bibliographiques

- Kirov, S.M., Castrisios, M., Shaw, J.G., 2004.** *Aeromonas flagella* (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect. Immun.* 72 : 1939 – 1945.
- Kirov, S.M., Webb, J.S., O'May, C.Y., Reid, D.W., Woo., J.K., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2007.** Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiol.* 153 : 3264 -3274.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003.** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.*, 48 : 1511 - 1524.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clary, J., Kolter, R., Losick, R., 2010.** D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Sci.* 328 : 627 – 629.
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006.** Microbial sciences : the superficial life of microbes. *Nature* 441 : 300 - 302.
- Konovalova, A., Wegener-Feldbügge, S., Søgaard-Andersen, L., 2012.** Two intercellular signals required for fruiting body formation in *Myxococcus xanthus* act sequentially but non-hierarchically. *Mol. Microbiol.* 86 : 65 – 81.
- Konovalova, A., Wegener-Feldbrügge, S., Søgaard-Andersen, L., 2012.** Two intercellular signals required for fruiting body formation in *Myxococcus xanthus* act sequentially but non hierarchically. *Mol. Microbiol.* DOI : doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08173.x.
- Kuenemann, P., 1991.** Contribution à l'étude de la biodégradation des composés organiques dans l'environnement. Thèse de doctorat. Option : Toxicologie de l'environnement. Université de Metz. Disponible sur : <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775945>.
- Laberche, J.C., 2004.** Biologie végétale. 2^e édition. Dunod, Paris, p.206.
- Lee, M.S., Morrison, D.A., 1999.** Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* Linking Quorum Sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* 181 :5004-5016.
- Lee, S.F., Li, Y.H., Bowden, G.H., 1996.** Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect. Immun.* 64 : 1035 – 1038.
- Lemon, K.P., Higgins, D.E., Kolter, R., 2007.** Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 189 : 4418-4424.
- Léveque, C., Mounolou, J.C., 2008.** Biodiversité : Dynamique biologique et conservation. 2^{ème} Edition .Dunod. Paris. p.259.
- Lewis, K., 2001.** Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 45 : 999 – 1007.
- Lindbäck, T., Rottenberg, M.E., Roche, S.M., Rørvik, L, Marit, M., 2010.** The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet. Res.* 41: 308-318.
- Liu, S., Lewis, K., 2000.** A dose –response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob agents chemother.* 44 : 640 – 646.
- Lock, M., Wallace, R., Costerson, J., Ventullo, R., Charlton, S., 1984.** River epilithon : toward a structural functional model. *Oikos.* 42 : 10-22.
- Lodge, R.M., Hinshelwood, C.N., 1943.** Physicochemical aspects of bacterial growth. Part IX. The lag phase of bact. *Lactis aerogenes*. *J. Chem. Soc.* 35 : 213-219.

Références bibliographiques

- Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R., 2009.** Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.*74 : 609-618.
- Lüttge, U., Kluge, M., Bauer, G., 2002.** Botanique. 3^e édition. Lavoisier. p.464.
- Macia, M.D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J.L., Olivier, A., 2005.** Hypermutation is a key factor in development of multiple antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 49 : 3382 -3386.
- Madsen, E.L., 1991.** : Determining *in situ* biodegradation. Facts and challenges. *Environ. Sci.Technol.* 25 : 1663-1673.
- Madsen, E.L., 1991.** Determining *in situ* biodegradation. Facts and challenges. *Environ. Sci. Technol.* 25 : 1663-1673.
- Mann, E.E., Rice, K.C., Bole, B.R., 2009.** Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One.*, 4 : 582-590.
- Marchal, M., 2010.** Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat : option : Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie. Université de Strasbourg. P.215. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr>.
- Mardigan, M., Martinko, J., 2007.** Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition, Pearson France. p.915.
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., Pesci, C.E., 2000.** The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gen. Mol. Biol.* DOI : 10.1128/JB.182.10.2702-2708.2000.
- Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A., 2004.** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} édition Doin. Biosciences et techniques.p.252.
- Michaud, M., 2005.** Impact environnemental des cultures transgéniques : La migration des transgènes. *Phytoprotection.* 86 : 93-105.
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001.** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55 : 165 - 199.
- Milton, D.L., 2006.** Quorum sensing in vibrios : Complexity for diversification. *Int. J. Med. Microbiol.* 296 : 61 – 71.
- Monod, J., 1958.** Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. 2^{ème} édition.Hermann, Paris
- Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruño, M., López, J.A., Barcina, I., 2008.** Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 28-36.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Foster, K.R., 2009.** The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 33 : 206 – 224.
- Nauciel, C., Vildé, J.L., 2007.** Bactériologie médicale : connaissance et pratique. 2^{ème} édition. Masson. p.272.
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970.** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104 : 313 – 322.
- Nilsson, L., Oliver, J.D., Kjelleberg, S., 1991.** Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 173: 5054-5059.

Références bibliographiques

- Nyström, T., 2001.** Not quite dead enough : on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch. Microbiol.* 176: 159-164.
- O’Neil, H.S., Marquis, H., 2006.** *Listeria monocytogenes* flagella are used for mobility, not as adhesins to increase host cell invasion. *Infect. Immunol.*, 74 : 6675-6681.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000.** Biofilm formation as microbial development. *Annu.Rev.Microbiol.*, 54 : 49 – 79.
- O’Toole, G.A., Kolter, R., 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 30 : 295-304.
- Ohno, A., Kato, N., Yamada, K., Yamaguchi, K., 2003.** Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 : 2540-2547.
- Oke, V., Long, S.R., 1999.** Bacteroid formation in the Rhizobium–legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiol.* 2: 641–646.
- Oliver, J. D., 2005.** The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43 : 93 - 100.
- Oliver, J.D., Bockian, R., 1995.** In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2620-2623.
- Patzelt, D., Wang, H., Buchholz, M., Rohde, M., Grobe, M., 2013.** You are what you talk : quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae*. *ISME J.* 7 : 2274–2286.
- Pellicic, V., 2008.** Type IV pili : e pluribus unum ?. *Mol. Microbiol.*, 68 : 827 - 837.
- Perru, O., 2006.** Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. | The origins of research on symbiosis (1868-1883). *Rev. d’histoire sci.* 59 : 5-27.
- Perry, J.J., Staley, J.T., Lory, S., 2004.** *Microbiologie : Cours et questions de révision.* Dunod. Paris.p.891.
- Peterson, B.J., Hobbie, J.E., Corliss, T.L., 1983.** A continuous-flow periphyton bioassay : Tests of nutrient limitation in a tundra stream. *Limnol. Ocean.* 28 : 583-591.
- Petit, A., Delhaye, S., Tempé, J., Morel, G., 1970.** Recherche sur les guanidines des tissus de Crown Gall. Mise en évidence d’une relation biochimique spécifique entre les souches d’*Agrobacterium* et les tumeurs qu’elles induisent. *Physiol.Veg.* 8: 205-213.
- Picek, T., Simek, M., Santruckova, H., 2000.** Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. *Biol. Fert. Soils* .31 : 315-322.
- Pollock, T.J., van Workum, W.A., Thorne, L., Mikolajczak, M.J., Yamazaki, M., Kijne, J.W., Armentrout, R.W., 1998.** Assignment of biochemical function to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharides in *Sphingomonas* strain S88 and *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.*180 : 586 -593.
- Ponder, R.G., Fonville, N.C., Rosenberg, S.M., 2005.** A switch from high-fidelity to error-prone DNA double-strand break repair underlies stress-induced mutation. *Mol. Cell.*, 19 : 791 - 804.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003.** *Microbiologie.* De Boeck & Larcier, Bruxelles, Pyrzynska, K., 2002. Determination of Selenium Species in Environmental Samples. *Microchimica Acta.* 140 : 55-62.

Références bibliographiques

- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 2003.** Microbiologie. DeBoeck & Larcier, Bruxelles, Pyszynska, K., 2002. Determination of Selenium Species in Environmental Samples. *Microchimica Acta*. 140 : 55-62.
- Prescott, W., Harley, S., Klein, W., 2010.** Microbiologie. 3^{ème} édition de boeck université. Paris.p.916.
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W.J., Stoodley, P., 2005.** Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiol*. 151 :1569-1576.
- Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W., 2007.** The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,104 : 8113 – 8118.
- Ricklefs, R.E., Miller, G., 2000.** Ecology. Edition Freeman. New York. p.822.
- Ruby, E.G., Lee, K.H., 1998.** The *Vibrio fischeri*- *Euprymna scolopes* light organ association : current ecological paradigms. *Appl. Env. Microbiol*. 64 : 805 – 812.
- Ruimy, R., Andremont, A., 2004.** Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* : molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation* 13 : 176–184.
- Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D.J., 2007.** Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10 : 644 - 648.
- Sabater, S., Guasch, H., Romaní, A.M., Muñoz, I., 2002.** The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiol*.469 : 149-156.
- Sahgal, M., Johri, B.N., 2003.** The changing face of rhizobial systematics. *Current Sci*. 84 : 43-48.
- Sakuragi, Y., Kolter, R., 2007.** Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*.189 : 5383 - 5386.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002.** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotype during development as a biofilm. *J. Bacteriol*.184 : 1140 – 1154.
- Schooling, S.R., Beveridge, T.J., 2006.** Membrane vesicles : an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol*.188 : 5945 - 5957.
- Schooling, S.R., Hubley, A., Beveridge, T.J., 2009.** Interaction of DNA with biofilm derived membrane vesicles. *J. Bacteriol*. 191 : 4097 - 4102.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P., 2003.** Identification, Timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum controlled genes : A transcriptome analysis. *J. Bacteriol*.185 : 2066 – 2079.
- Sigee, D.C., 2005.** Freshwater Microbiology : Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. Edition John Wiley and Sons Ltd. England.p.537.
- Sigg, L., Behra, P., Stumm, W., 2000.** Chimie des milieux aquatiques. Dunod, Paris. p. 567.
- Signoretto, C., Lleo, M.M., Canepari, P., 2002.** Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol*. 44 : 125-131.
- Sims, J.L., Sims, R.C., Matthews, J.E., 1990.** Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazard. Waste & Hazard. Mat*.7 : 117 -149.

Références bibliographiques

- Slattery, M., Rajbhandari, I., Wesson, K., 2001. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microb Ecol.* 41 : 90 –96.
- Sorensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N., Wuertz, S., 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ : a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 : 700 – 710.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambrisky, P., 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plants cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochem.* 27:2781-2785.
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R., Hacker, J., 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *App. Enviro. Microbiol.* 63 : 2047-2053.
- Stengel, P., Gelin, S., 1998. Sol : Interface fragile. INRA, Paris. 213 p.
- Stewart, P.S., 1998. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective coefficients in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 59 : 261-272.
- Stewart, P.S., Franklig, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 : 199 – 210.
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat.Rev. Microbiol.* 6 : 199 - 210.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilm as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 : 187 - 209.
- Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P., Griffiths, M. W., 2006. Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. *J. food protection.* 69 : 2747-2753.
- Thomas, V.C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., Hancock, L.E., 2009. A fratricidal mechanism is responsible for DNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Mol.Microbiol.* 72 :1022- 1036.
- Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Spormann, A.M., 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J. Bacteriol.*, 187 : 1014-1021.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., Molin, S., 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* Biofilms. *J. Bacteriol.* 182 : 6482 – 6489.
- Tolker-Nielsen, T., Molin, S., 2000. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.* 40 : 75 – 84.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., Martin, L., 2003. Introduction à la microbiologie. Editions du renouveau pédagogique Inc. P.945.
- Tourte, Y., Bordonneau, M., Henry, M., Tourte, C., 2005. Le monde des végétaux. Organisation, physiologie et génomique. Dunod, Paris. p.560.
- Valentine, I., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* and the plant : the David and Goliath of modern genetics (update on *Agrobacterium*-mediated transformation of plants). *Plant physio.* 133: 948-955.
- Van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S., Zehnder, A.J.B., 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56 : 677-694.

Références bibliographiques

- Van der Mei, H.C., Bos, R., Busscher, H.J., 1998.** A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces*. 11 : 213 – 221.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperrort, R.A., Schell, J., 1974.** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for Crown Gall-inducing ability. *Nature*. 252:169-170.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J., 2008.** Living on a surface : swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol*. 16 : 496 - 506.
- Wadowsky, R.M., Wolford, R., McNamara, A.M., Yee, R.B., 1985.** Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *App. Environ. Microbiol*. 49 : 1197-1205.
- Wagner, M., Manz, B., Volke, F., Neu, T.R., Horn, H., 2010.** Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. *Biotechnol. Bioeng*. 107 : 172–181.
- Walters, M., Sperandio, V., 2006.** Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Inter. J. Medi.Microbiol*. 296 : 125- 131.
- Water, C., Bassler, B., 2005.** Quorum sensing : cell to cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 21 : 319 – 346.
- Webb, J.S., Lau, M., Kjelleberg, S., 2004.** Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol*. 186 : 8066 – 8073.
- Weber, K.A., Urrutia, M.M., Churchill, P.F., Kukkadapu, R.K., Roden, E.E., 2006.** Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Envir.Microbiol*. 8 : 100-113.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002.** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Sci*. 295 : 1487-1495.
- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P., 2001.** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 413 : 860 – 864.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2008.** *Microbiology*. Seventh Edition. Toronto.p.1222.
- Wilson, W.W., Wade, M.M., Holman, S.C., Champlin, F.R., 2001.** Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Methods*. 43 : 153 – 164.
- Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U., 2000.** Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol*. 24 : 661 - 671.
- Winslow, C.E.A., Wilson, H.H., 1939.** The earlier phases of the bacterial culture cycle. *Bacteriol. Rev*. 3 : 147-186.
- Xu, H.S., Roberts, N.C., Singleton, F.L., Atwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R., 1982.** Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Evol*. 8 : 313-323.
- Yamamoto, H., 2000.** Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore forming bacteria and its modeling. *J. Infect. Chemother*. 6 : 112-114.

Références bibliographiques

- Yang, L., Nilsson, M., Gjermansen, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2009.** Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 74 : 1380–1392.
- Zan, J., Choi, O., Meharena, H., Uhlon, C.L., Churchill, M.E.A., Hill, R.T., Fuqua, C., 2015.** A solo *lusI*-type gene directs acylhomoserine lactone synthesis and contributes to mobility control in the marine sponge symbiont *Ruegeria sp.* KLH11. *Microbiol.* 161 : 50-56.
- Zhong, L., Chen, J., Zhang, X.H., Jiang, Y.A., 2009.** Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. *Lett. App. Microbiol.* 48: 247 252.
- Zobell, C. E. 1943.** The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology.* *J. Bacteriol.* 46 : 39-56.
- Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1992.** Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *J. Appl. Bacteriol.* 72 : 139-145.

Sites :

- [1] : Disponible sur : <http://www.ecosociosystemes.fr>. Consulté : le 04/02/2019.
- [2] : Disponible sur : <https://occitanie.chambreagriculture.fr>. Consulté le 02/02/2020.
- [3] : Disponible sur : <https://www.esst-inrs.fr>. Consulté le 13/02/202.
- [4] : Disponible sur : <http://aeema.vet-alfort.fr>. Consulté le : 13/02/2020.