

Comparaison de deux techniques de quantification d'un biofilm bactérien en présence d'agents bactéricides

AUTEURS

Sylvaine QUATRAVAUX,
Sandra RODRIGUES,
Nicolas DESROCHE,
Jean GUZZO
et Patrice ARBAULT

Nexidia SAS, ENESAD,
26 Boulevard du Docteur Petitjean,
21079 DIJON Cedex

Les **biofilms bactériens** constituent une forme de résistance des bactéries contre les agents antibactériens. Ces biofilms sont capables de coloniser les plaies et sont reconnus comme étant impliqués dans des infections chroniques en milieu hospitalier. Les nombreuses recherches sur les biofilms ont nécessité la mise au point de techniques de quantification. Notre étude a consisté à mettre en œuvre deux techniques de quantification de biofilm : (i) la **coloration au cristal violet (CV)**, et (ii) le **dénombrement des bactéries par étalement sur boîtes de Pétri** afin de mesurer l'effet bactéricide de **pansements TLC-Ag**.



Matériel biologique :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (souche résistante à la méthicilline)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

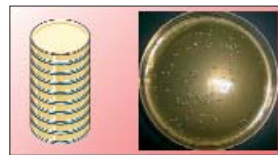
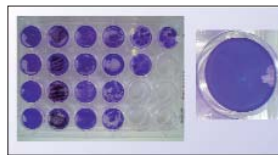
Modèle expérimental in vitro :

- Formation des biofilms à 37°C dans des plaques de polystyrène 24 puits pendant 24h
- Mise en contact avec le pansement **Urgotul®** (Témoins) et pansement **TLC-Ag** pendant 1 jour, 2 jours et 3 jours

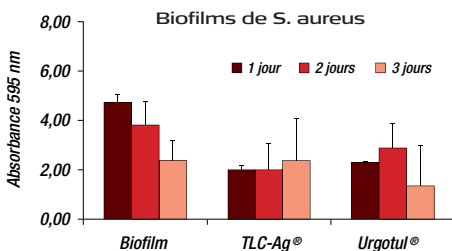
Quantification du biofilm ayant adhéré par deux techniques

- Méthode semi quantitative par dosage de la quantité de cristal violet relarguée (1)
- Dénombrement des bactéries sur milieu gélosé

Coloration au Cristal Violet

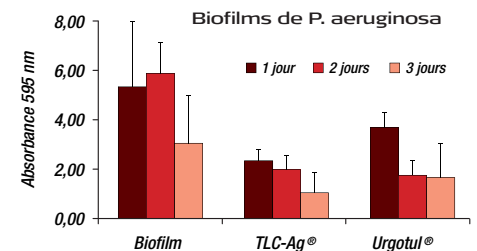


Dénombrement sur milieu gélosé



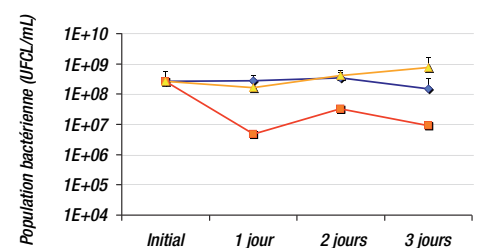
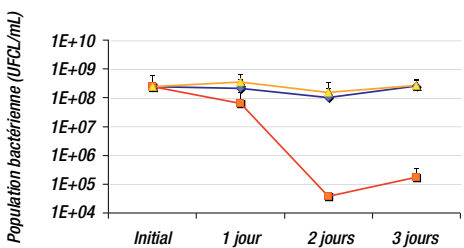
Coloration au cristal violet (CV)

- Interférence de la trame TLC avec le cristal violet (absorption aspécifique et aléatoire du colorant)
 - Réduction de la quantité de bactéries au sein du biofilm après contact avec le pansement TLC-Ag (diminution DO595_{nm})
- ➔ **Effet bactéricide du pansement TLC-Ag**

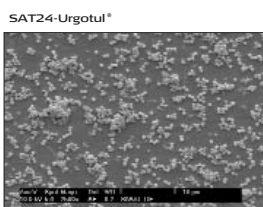


Dénombrement en milieu gélosé

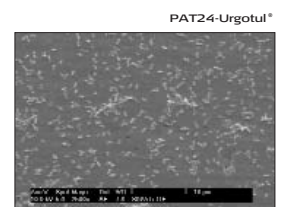
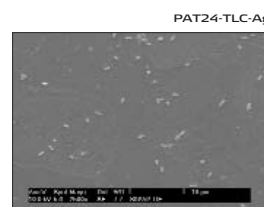
- Destruction à 99,93 % d'un biofilm de *S.aureus* âgé de 24 h. Effet maximum après 2 jours de contact
 - Destruction à 98% d'un biofilm de *Paeruginosa* âgé de 24 h. Effet maximum après 1 jour de contact .
- ➔ **Effet bactéricide du pansement TLC-Ag**



Confirmation des résultats par observation en MEB sur coupons d'acier (x2500)



- Réduction de la quantité de bactéries et de la formation d'agrégats
 - Effet du pansement TLC-Ag sur la structure des biofilms
- ➔ **Pas de formation de réseau de bactéries en présence de pansement TLC-Ag**



CONCLUSION

L'effet antimicrobien du pansement TLC-Ag est mis en évidence par les deux techniques de quantification. La méthode au cristal violet permet d'évaluer le biofilm de manière non linéaire et semi quantitative. De plus, la trame TLC induit des interférences en absorbant le cristal violet de façon aspécifique rendant l'interprétation des résultats difficiles. La technique de dénombrement sur milieu gélosé permet, quant à elle, d'évaluer précisément la chute de population bactérienne de façon logarithmique. Cette technique est plus adaptée à l'étude de l'action de pansements antimicrobiens sur le biofilm et est parfaitement corrélée avec l'effet bactéricide important observé en MEB.

Les biofilms bactériens de *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont détruits par le pansement TLC-Ag à 99,93% et 98% respectivement. Les observations microscopiques confirment l'effet antimicrobien du pansement TLC-Ag sur les biofilms formés de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ces résultats in vitro donnent un nouvel éclairage sur les données obtenus en clinique avec les pansements TLC-Ag.

(1) Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 68(6): 2950-2958