



N° d'ordre :41/2016

Fès le 10/12/2016

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme : Zineb GHAZLANE

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Au titre de l'année 2015/2016

Sujet de Thèse :

Risques infectieux de biofilms bactériens dans le secteur médical, agroalimentaire et environnemental : Approches de lutte par procédés chimiques et enzymatiques

Thèse présentée et soutenue le **Samedi 10 Décembre 2016** devant le jury composé de :

<i>Présidente</i>	<i>Pr. Khadija BEKHTI</i>	<i>PES</i>	Faculté des Sciences et Techniques de Fès
<i>Directeur de thèse</i>	<i>Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI</i>	<i>PES</i>	Faculté des Sciences et Techniques de Fès
<i>Co-encadrant</i>	<i>Pr. Abdellah HOUARI</i>	<i>PES</i>	Faculté Polydisciplinaire Taroudant
<i>Rapporteur</i>	<i>Pr. Samir EL JAAFARI</i>	<i>PES</i>	Faculté des Sciences de Meknès
<i>Rapporteur</i>	<i>Pr. Kawtar FIKRI BENBRAHIM</i>	<i>PES</i>	Faculté des Sciences et Techniques de Fès
<i>Rapporteur</i>	<i>Pr. Zainab EL ALAOUI TALIBI</i>	<i>PES</i>	Faculté des Sciences et Techniques, Marrakech.
<i>Examineur</i>	<i>Pr. Amine GUENDOZ</i>	<i>PES</i>	Faculté des Sciences et Techniques, Marrakech.
<i>Invité</i>	<i>Dr. Mohammed TIMINOUNI</i>	<i>Docteur</i>	<i>Institut Pasteur</i>
<i>Invité</i>	<i>Dr. El Mostafa MLIJI</i>	<i>Docteur</i>	<i>Institut Pasteur</i>

*Laboratoire de Biotechnologie Microbienne
Faculté des sciences et technique-Fès
En collaboration avec le laboratoire de Bactériologie moléculaire
de l'Institut Pasteur du Maroc, Casablanca*

Résumé

Les biofilms peuvent être à l'origine de problèmes sérieux dont l'impact économique et sanitaire est considérable. Dans le but de développer des produits anti-adhésion et anti-biofilm moins toxiques pour l'environnement, nous avons mis au point un test modèle adapté aux milieux industriel, médical et environnemental permettant ainsi de détecter le potentiel de préparations désinfectantes et enzymatiques de type hydrolases à prévenir la formation ou éliminer les biofilms. Sept bactéries modèles ont été choisies pour leur forte adhésion en représentant les secteurs les plus touchés : Le secteur agroalimentaire représenté par *Escherichia coli* E1525 développée sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 développée sur des billes d'inox ; le secteur médical représenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 développées sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4 développées sur des coupons de cathéter ; le secteur environnemental représenté par *Pseudomonas aeruginosa* P59 développée sur des coupons cylindriques de polyéthylène. Le test développé permet également de vérifier la toxicité des préparations désinfectantes et enzymatiques sur les cellules non adhérentes par déterminations de CMI et CMB. D'ailleurs, les souches modèles étudiées en biofilms présentent une certaine résistance contre les désinfectants étudiés par rapport aux enzymes. Le désinfectant P4 est plus efficace et présente un effet préventif et curatif plus important en combinant entre trois principes actifs qui sont l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide. *Salmonella* spp S3349 est la souche la plus résistante en biofilm aux désinfectants et la plus sensible à l'action des enzymes. Les taux d'inhibition en fonction de la concentration en enzyme est une courbe sigmoïde de type dose-réponse pour certaines enzymes et une courbe sous forme de plateau qui atteint rapidement un maximum d'efficacité pour d'autres enzymes. Les protéases se sont révélées plus efficaces que les glycosidases en prévention comme en lavage pour les trois souches de *Staphylococcus* étudiées. Alors que pour *P. aeruginosa* P59 et *Salmonella* spp S3349, les glycosidases se sont démontrées plus efficaces que les protéases en prévention comme en lavage. Tandis que pour *E. coli* E1525 et *Streptococcus pyogènes* P4, les glycosidases se sont révélées plus efficaces que les protéases en prévention, or en lavage il semble que les protéases présentent une efficacité ayant une tendance à augmenter par rapport à la prévention d'un biofilm. L'étude de la composition de substances polymériques EPS produites par les sept bactéries modèles en fermenteur et au sein d'un biofilm a permis de mieux comprendre la nature des molécules organiques cibles impliquées dans l'inhibition de l'adhésion et l'élimination de biofilm.

Mots clés : anti-adhésion, anti-biofilm, désinfectants, enzymes, EPS, inox, verre, cathéter, tuyau de polyéthylène, extraction, élimination.

Summary

Biofilms can cause serious problems whose economic and health impact is considerable. In order to develop the anti-adhesion and anti-biofilm products less toxic to the environment, we have developed a model test adapted to the industrial, medical and ecological environment allowing thus to detect the potential of disinfectant and enzyme preparations type hydrolases to prevent the formation or the elimination of biofilms. Seven models of bacteria were chosen for their strong adhesion representing the most affected sectors: food industry represented by *Escherichia coli* E1525 developed on glass beads and *Salmonella* spp S3349 developed on stainless steel beads; the medical sector represented by *Staphylococcus warneri* K9 and *Staphylococcus sciuri* K17 developed on polystyrene, and by *Staphylococcus aureus* K1 and *Streptococcus pyogenes* P4 developed on catheter coupons, as well as the environmental sector represented by *Pseudomonas aeruginosa* P59 developed on polyethylene cylindrical coupons. The developed test also checks the toxicity of the disinfectant and enzyme preparations on non-adherent cells through the determination of MIC and MBC. Although strains models studied in biofilms showed some resistance against disinfectants studied compared to the enzymes. Disinfectant P4 was more effective presenting a most significant preventive and curative effect by combining three active ingredients which are alcohol, quaternary ammonium and biguanide. *Salmonella* spp S3349 was the most resistant strain in biofilm to disinfectants and the most sensitive to enzyme action. The rate of inhibition against the logarithm of the concentration of enzyme is a sigmoid curve type dose-response for certain enzymes and a tray curve which rapidly reaches maximum efficiency for other enzymes. Proteases have been more effective than glycosidases in prevention as in washing for all three strains of *Staphylococcus* studied. While for *P. aeruginosa* P59 and *Salmonella* spp S3349, glycosidases have proven more effective than proteases in prevention as in washing. Whereas for *E. coli* E1525 and *Streptococcus pyogenes* P4, glycosidases have proven more effective than proteases in prevention, or in washing it appears that the protease exhibit efficacy with a tendency to increase with respect to the prevention of biofilm. The study of the composition of polymeric substances EPS produced by the seven models bacteria in a fermenter and in a biofilm allowed to better understand the nature of the target organic molecules involved in inhibition of adhesion and removing biofilm.

Keywords: anti-adhesion, anti-biofilm, désinfectants, enzymes, EPS, stainless steel, glass, catheter, polyethylene pipe, extraction, removing.

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire de Bactériologie Moléculaire à l'Institut Pasteur (Casablanca, Maroc)

Je transmets mes vifs témoignages de reconnaissance à l'Institut Pasteur du Maroc en la personne de sa Directrice Docteur ELMDAGHRI Naima, d'avoir eu l'amabilité de m'accueillir au sein de son établissement.

Tout d'abord j'adresse mes vifs remerciements au Professeur KOURAICHI IBNSOUDA Saad d'avoir accepté de diriger cette thèse, ainsi qu'à mon coencadrant le Professeur HOUARI Abdelah. Je les remercie pour la grande liberté qu'ils m'ont accordée afin de mener à bien ce travail de recherche.

Je tiens à remercier chaleureusement l'encadrement assuré à l'Institut Pasteur de Casablanca, par le Docteur TIMINOUNI Mohammed de m'avoir accueillie dans son laboratoire de Bactériologie Moléculaire et pour m'avoir offert l'opportunité d'entamer ce travail de recherche dans un domaine aussi passionnant que porteur d'espoir, et le Docteur MLJJI El Mustafa pour son soutien tout au long de ces années de labeur. Les multiples discussions et échanges dont ils m'ont fait bénéficier, m'ont permis de mener à bien ces travaux de recherche et de développement. Leurs longues et irremplaçables expériences gracieusement mises à ma disposition, m'ont guidée judicieusement tout au long de ce travail. Je tenais, une fois encore, à leur exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir permis de me confirmer dans cette voie scientifique.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude au Professeur BEKHTI Khadija pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, ainsi qu'aux professeurs EL ALAOUI TALIBI Zainab, EL JAAFARI Samir et FIKRI BENBRAHIM Kawtar pour avoir donné de leur temps afin d'assurer la lourde tâche de juger ce manuscrit et d'être rapporteurs de ma thèse. J'exprime ma gratitude également aux Professeurs GUENDOOUZ Amine, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail tout en acceptant d'être membre de jury.

Remerciements

Je suis très reconnaissante au Vice Doyen le Professeur EL HADRAMI El Mestafa, chef de CED, et au Professeur Mustafa JAALI, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès ainsi que tous mes enseignants, pour avoir su me donner l'impulsion scientifique déterminante qui m'a guidée tout au long de mes études.

J'adresse mes vifs remerciements à mes amies Foziya, Loubna, Salwa et Wifak pour leur soutien inestimable, leur gentillesse, leur amour et leur immense générosité.

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées au laboratoire de Bactériologie moléculaire durant ce travail et qui m'ont apporté leur soutien individuel et collectif: Kaoutar NAIME, Foziya ELKBAKBI EL YAAGOUBI, Loubna JAMALI et Salwa OUFRIID, Abou Dihaj BARGUIGA. Ce fût pour moi très intéressant de vous côtoyer jour après jour dans une ambiance sympathique et détendue.

Je n'oublierai pas de remercier les équipes des laboratoires de virologie, de contrôle de qualité alimentaire et de biochimie pour leur aide, leur patience et leurs conseils avisés.

Enfin, un grand merci à mes chers parents, ma tante et toute ma famille pour leur soutien inestimable, ainsi qu'à mes sœurs Asmae et laila pour leur présence et leurs encouragements sans faille. Merci à mon mari GHANMI Youssef pour sa patience et son soutien et tout particulièrement à ma fille Najlae que j'aime tant. Je vous suis grandement reconnaissante à vous tous d'avoir cru en moi, en mes choix de vie et d'orientation scientifique et professionnelle.

Supportée par vous tous, j'ai pu achever ce travail de recherche.

Liste des communications

Communications orales

- L'utilisation des enzymes contre les biofilms de l'environnement hospitalier du service d'hémodialyse.

GHAZLANE Zineb, OUFRIJ S., ELMDAGHRI N., JAMALI L., HOUARI A., KIBNSOUDA S., TIMINOUNI M., MLIJI E.

5ème colloque bioadhésion-biocontamination des surfaces, 12-14 Novembre 2014, Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal, Maroc.

- Contribution à la lutte contre les biofilms dans le secteur agroalimentaire par l'utilisation des enzymes.

GHAZLANE Zineb, TIMINOUNI M., OUFRIJ S., JAMALI L., LATRACHE H., KIBNSOUDA S., HOUARI A., MLIJI E.

4^{ème} congrès maghrébin sur les toxi-infections alimentaires, 16-18 Avril 2014, Palais des congrès, Fès, Maroc.

- Formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogènes* sur les cathéters : Extraction des EPS et dosage de leur composition.

GHAZLANE Zineb, OUFRIJ S., HOUARI A., KIBNSOUDA S., MLIJI E., TIMINOUNI M.

Symposium international de « Bio-adhésion, Biofilms », 28 Mai 2013, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques, Fès, Maroc.

- Effets des composés majoritaires des huiles essentielles sur la formation du biofilm par trois souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

GHAZLANE Zineb, EL ABED S., KIBNSOUDA S.

Congrès international sur la recherche, la biotechnologie et le consommateur au service de l'environnement et de l'industrie agroalimentaire, 19 et 20 mai 2011, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc.

Communications affichées

- Risques infectieux des biofilms dans les canalisations d'eau potable et leur maîtrise par l'utilisation de produits désinfectants.

GHAZLANE Zineb, OUFRIJ S., JAMALI L., HOUARI A., KIBNSOUDA S., TIMINOUNI M., ELMDAGHRI N., MLIJI E.

Congrès international Bioses, 22-24 octobre 2015, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques, Fès, Maroc.

- Lutte contre le biofilm dans l'industrie agroalimentaire : Approche par procédés enzymatiques.

GHAZLANE Zineb, MLIJI E., OUFRIID S., JAMALI L., KIBNSOUDA S., HOUARI A., ELMODAGHRI N., TIMINOUNI M.

Congrès international Bioses, 22-24 octobre 2015, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques, Fès, Maroc.

- Lutte contre les biofilms et leurs risques infectieux dans l'environnement hospitalier du service d'hémodialyse par l'utilisation des enzymes.

GHAZLANE Zineb, OUFRIID S., JAMALI L., HOUARI A., KIBNSOUDA S., TIMINOUNI M., ELMODAGHRI N., MLIJI E.

Congrès international Bioses, 22-24 octobre 2015, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques, Fès, Maroc.

- Biofilm de *salmonella* dans l'industrie agroalimentaire: Risques infectieux et Approche de lutte par procédés enzymatiques.

GHAZLANE Zineb, MLIJI E., OUFRIID S., JAMALI L., HOUARI A., KIBNSOUDA S., ELMODAGHRI N., TIMINOUNI M.

Journée Scientifique de l'Institut Pasteur du Maroc, 02 décembre 2015, Institut Pasteur, Casablanca, Maroc.

- Evaluation de l'activité anti-biofilm de cinq désinfectants utilisés dans le service d'hémodialyse.

GHAZLANE Zineb, GHANMI Y., KAROUANI A., OUFRIID S., JAMALI L., HOUARI A., MLIJI E., TIMINOUNI M.

6^{èmes} Journées Maghrébines et 3^{ème} Congrès National d'Hygiène Hospitalière, 15 et 16 Novembre 2013, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Casablanca, Maroc.

- Les biofilms et leurs risques infectieux dans l'environnement hospitalier du service d'hémodialyse.

GHAZLANE Zineb, GHANMI Y., KAROUANI A., OUFRIID S., JAMALI L., HOUARI A., TIMINOUNI M., MLIJI E.

6^{èmes} Journées Maghrébines et 3^{ème} Congrès National d'Hygiène Hospitalière, 15 et 16 Novembre 2013, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Casablanca, Maroc.

- Risques infectieux liés aux biofilms dans le service d'hémodialyse.

GHAZLANE Zineb, GHANMI Y., KAROUANI A., OUFRIID S., HOUARI A., TIMINOUNI M., MLIJI E.

Symposium international de « Bio-adhésion, Biofilms », 28 Mai 2013, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et Techniques, Fès, Maroc.

- Effet des composés majoritaires des huiles essentielles sur la formation du biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* CIPA22.

GHAZLANE Zineb, EL ABED S., KIBNSOUDA

3^{ème} Congrès international sur l'amélioration de la production agricole, 09 et 10 Mars 2011, Faculté des Sciences et Techniques, Settat, Maroc.

Publications

- Anti-adhesion and Anti-biofilm Effectiveness of Disinfectants Used in Hemodialysis against both *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus sciuri* biofilms.

Ghazlane Zineb, Mlji El Mostafa, Ghanmi Youssef, Kerouani Abdellatif, Oufriid Salwa, Houari Abdellah, K. Ibnsouda Saad, Elmdaghri Naima, Timinouni Mohammed.

International Journal of Engineering Research and Applications. Vol. 4, Issue 7(Version 2) , pp.86-92, July 2014.

Impact Factor: 1.69

- Virulence phenotype, physicochemical properties and biofilm formation of *P. aeruginosa* on polyethylene used in drinking water distribution systems.

Ghazlane Zineb, Latrache Hassan, Mabrouki Mostafa, Houari Abdellah, K. Ibnsouda Saad, Timinouni Mohammed, Elmdaghri Naima, Mlji El Mostafa.

International Journal of Engineering Research and Applications. Vol. 4, Issue 7(Version 2), pp.75-85, July 2014

Impact Factor: 1.69

- Correlation between *staphylococcal* biofilm formation in vitro and catheter-related infections potential in vivo.

Salwa Oufriid, Zineb Ghazlane, Loubna Jamali, Fatima El Otmani, Mustapha Talmi, Naima Elmdaghri, Khalid Zerouali, Mohammed Timinouni.

Journal of Infection in Developing Countries. Vol. 9(4), pp. 368-372, 2015.

Impact Factor: 1.67

- Prévalence des gènes de résistance plasmidique aux quinolones chez des entérobactéries communautaires isolées au Maroc.
Loubna Jamali, Fatima Haouzane, Mohammed Bouchakour, Salwa Oufrid, Zineb Ghazlane, Naima El Mdaghri, Sellama Nadifi, Mohammed Timinouni.
International Journal of Innovation and Scientific Research. Vol. 11, pp. 387-399, 2 Nov. 2014.
Impact Factor: 3.917
- Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation.
El Abed Soumya, IBNSOUDA KORAICHI Saad, L'ATRACHE Hassan, Zineb GHAZLANE, MOURADI Hind, REMMAL Adnane.
African Journal of Microbiology Research Vol. 5(20), pp. 3229-3232, 30 September, 2011.
Impact Factor: 0.539

Sommaire

Résumé	i
Remerciements	iii
Liste des communications	v
Sommaire	ix
Liste des abréviations	xiv
Liste des tableaux	xv
Liste des figures	xvi
Introduction	1
Chapitre I - Etude bibliographique	6
1. Biofilms	6
1.1. Structure des biofilms	6
1.1.1 Grande diversité de biofilms	6
1.1.2 Organisation structurale commune	7
1.1.3 Principaux constituants du biofilm	8
1.1.3.1 Exopolysaccharides	10
1.1.3.2 Protéines	13
1.1.3.3 Lipides	13
1.2. Méthodes d'étude des biofilms	14
1.2.1 Choix des micro-organismes	14
1.2.2 Monoculture et polyculture : meilleur reflet de la réalité biologique	14
1.2.3 Différentes méthodes d'obtention des biofilms	15
1.3. Formation et écologie des biofilms	16
1.3.1 Etapes de formation d'un biofilm	17
1.3.2 Attachement primaire réversible et non spécifique à une surface (adhérence)	17
1.3.3 Attachement secondaire irréversible et spécifique à une <i>surface (adhésion)</i>	18
1.3.4 Phases précoces de développement du biofilm. Maturation du biofilm	19
1.3.5 Evolution et plasticité du biofilm	20
1.3.6 Essaimage et dispersion du biofilm	21
1.3.7 Ecologie des biofilms	22
1.3.7.1 Facteurs influant sur la formation de biofilms	23
1.3.7.2 Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm	24

1.4.	Problèmes liés aux biofilms	24
1.4.1	Biofilms dans le secteur médical	25
1.4.2	Biofilm dans le secteur alimentaire	26
1.4.3	Biofilm dans le secteur environnemental	27
1.5	Moyens de lutte contre les biofilms	27
1.5.1	Empêcher la formation de biofilms	28
1.5.2	Eliminer des biofilms déjà formés	28
1.5.3	Etudes d'éradication de biofilms au Maroc	29
2.	Désinfectants	33
2.1.	Historique	33
2.2.	Définition	34
2.3.	Activité antimicrobienne des désinfectants	34
2.4.	Principales familles de désinfectants	34
2.4.1	Produits à action létale non spécifique	35
2.4.1.1	Oxydants	35
2.4.1.2	Halogènes et dérivés	35
2.4.1.3	Acides et bases	35
2.4.1.4	Alcools	35
2.4.1.5	Aldéhydes	36
2.4.2	Produits à action létale spécifique	36
2.4.2.1	Ammoniums quaternaires	36
2.4.2.2	Biguanides	37
2.4.2.3	Dérivés phénoliques	37
2.5.	Mécanismes d'actions générales des désinfectants	38
3.	Enzymes	41
3.1	Hydrolases	41
3.1.1	Protéases	42
3.1.1.1	Protéases à sérine – Subtilisine	42
3.1.1.2	Protéases à cystéine – Papaine	43
3.1.1.3	Métallo-protéases	44
3.1.1.4	Protéases à acide aspartique	44
3.1.2	Glycosidases	44
3.1.2.1	Cellulases	45
3.1.2.2	α -Amylases	45

3.1.2.3	Xylanases	46
3.1.2.4	Pectinases	46
3.1.3.	Estérases et lipases	46
3.2.	Mélanges enzymatiques commerciaux	47
3.2.1	Production	47
3.2.2	Applications	48
Chapitre – II : Matériels et méthodes		53
1.	Produits à potentiel anti-biofilm	53
1.1.	Désinfectants	53
1.2.	Enzymes	53
2.	Microbiologie	55
2.1.	Souches bactériennes	55
2.2.	Conditions de culture	55
3.	Détermination de l'activité inhibitrice de croissance des différentes molécules sur des bactéries planctoniques	56
4.	Détermination de l'activité bactéricide de croissance des différentes molécules sur des bactéries planctoniques	57
5.	Formation du biofilm en microplaque	58
5.1.	Suspension bactérienne	58
5.2.	Biofilm en microplaque	59
5.3.	Cristal Violet : Essai de coloration	59
6.	Traitements du biofilm	60
6.1.	Plan de microplaque	60
6.2.	Protocole de prévention	62
6.3.	Protocole de lavage	62
7.	Caractérisation des EPS	63
7.1.	EPS issus de fermentation	63
7.2.	Culture en fermenteur	63
7.3.	La détermination quantitative de cellules viables	63
7.4.	L'extraction des substances polymériques extracellulaires (EPS)	63
7.5.	Dosages colorimétriques	64
7.5.1.	Dosage des glucides	64
7.5.2.	Dosage des protéines	64
Chapitre III : Biofilm en microplaque		65
1.	Modèle du secteur environnemental	66

2. Modèle du secteur agroalimentaire _____	67
3. Modèle du secteur médical _____	68
4. Discussion _____	69
Chapitre IV : Potentiel antimicrobien des désinfectants _____	71
1. Activité désinfectante contre des bactéries planctoniques _____	71
1.1. Concentration minimale inhibitrice CMI _____	71
1.2. Concentration minimale bactéricide CMB _____	72
2. Activité désinfectante contre des bactéries en biofilm _____	75
2.1. Potentiel préventif (anti-adhésif) des quatre désinfectants analysés _____	75
2.2. Potentiel anti-biofilm des quatre désinfectants analysés _____	79
2.2.1. Potentiel anti-biofilm contre <i>P. aeruginosa</i> P59 _____	79
2.2.2. Potentiel anti-biofilm contre <i>E. coli</i> E1523 _____	80
2.2.3. Potentiel anti-biofilm contre <i>Salmonella</i> spp S3349 _____	81
2.2.4. Potentiel anti-biofilm contre <i>S. pyogènes</i> P4 _____	82
2.2.5. Potentiel anti-biofilm contre <i>S. aureus</i> K1 _____	83
2.2.6. Potentiel anti-biofilm contre <i>S. sciuri</i> K17 _____	84
2.2.7. Potentiel anti-biofilm contre <i>S. warneri</i> K9 _____	85
2.3. La résistance des biofilms bactériens aux désinfectants : discussion générale _____	86
2.3.1 Limitations de diffusion / de réaction de désinfectants dans les biofilms _____	88
2.3.2 Adaptations phénotypiques des cellules de biofilm à des concentrations sublétales de désinfectants _____	91
2.3.3 Adaptations phénotypiques des cellules à l'intérieur du biofilm _____	93
2.3.4 Gènes de transferts et de mutations _____	95
2.4. Conclusion _____	97
Chapitre V : Potentiel antimicrobien des enzymes _____	98
1. Activité enzymatique contre des bactéries planctoniques _____	100
1.1. Concentration minimale inhibitrice CMI _____	100
1.2. Concentration minimale bactéricide CMB _____	100
2. Activité enzymatique contre des bactéries en biofilm _____	101
2.1. Protéases _____	101
2.1.1 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>P. aeruginosa</i> P59 _____	101
2.1.2 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>E. coli</i> E1523 _____	103
2.1.3 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>Salmonella</i> spp S3349 _____	104
2.1.4 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. pyogènes</i> P4 _____	106

2.1.5	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. aureus</i> K1	107
2.1.6	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. sciuri</i> K17	108
2.1.7	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. warneri</i> K9	110
2.1.8	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre les sept souches (schéma récapitulatif)	111
2.2	Glycosidases	114
2.2.1	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>P. aeruginosa</i> P59	114
2.2.2	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>E. coli</i> E1523	116
2.2.3	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>Salmonella</i> spp S3349	117
2.2.4	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. pyogènes</i> P4	119
2.2.5	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. aureus</i> K1	120
2.2.6	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. sciuri</i> K17	122
2.2.7	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre <i>S. warneri</i> K9	123
2.2.8	Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre les sept souches (schéma récapitulatif)	125
2.3	Discussion	127
2.3.1	Efficacité des enzymes et nature des molécules organiques ciblées	128
2.3.2	Efficacité des enzymes et adsorption	132
2.3.3	<i>Salmonella</i> spp S3349 : la souche en biofilm la plus résistante aux désinfectants la plus sensible aux enzymes	133
2.4	Conclusion	135
Chapitre VI : Substances polymériques extracellulaires		136
1.	Croissance et cellules viables des sept bactéries étudiées	136
2.	Concentrations en EPS, en protéines et en carbohydrates	139
3.	Discussion	140
3.1.	L'effet de la concentration des nutriments sur le rendement de biofilm	140
3.2.	Les concentrations de protéines et de glucides dans les EPS de biofilm	140
4.	Conclusion	143
Discussion et Conclusions générales		144
Perspectives		149
Références		151

Liste des abréviations

AFM : microscopie à force atomique

AFNOR : association française de normalisation

AND : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ASB : albumine de sérum bovin

ATR-FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier - réflectance totale atténuée

CEN : comité européen de normalisation CEN

CLSM : microscopie confocale à balayage laser

CMB : concentration minimale bactericide

CMI : concentration minimale inhibitrice

EC : enzyme commission

EPS : substances polymériques extracellulaires

GPI : glycosyl phosphatidyl inositol

IgA : immunoglobulines A

LB : Luria-Bertani

LPS : lipopolysaccharide

MATS : tests d'adhésion microbienne aux solvants

MEB : microscopie électronique à balayage

NCCLS : comité national des normes cliniques de laboratoire

OCDE : organisation de coopération et de développement économique

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PIB : produit intérieur brut

PBS : tampon phosphate salin

QAC : composé d'ammonium quaternaire

QS : quorum sensing

Re : nombre de Reynolds

rpm : tour par minute

UFC : unité formant colonie

UV : ultra violet

XPS : spectroscopie de photoélectrons induite par rayons X

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des EPS d'après Flemming et Wingender, 2001.

Tableau 2 : Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm. D'après (Donlan et Costerton, 2002).

Tableau 3 : Mécanisme de l'action antimicrobienne des désinfectants (Massicotte, 2009).

Tableau 4 : Enzymes dont l'utilisation est brevetée dans des compositions de lavages et/ou contre la formation de biofilms.

Tableau 5 : Compositions des désinfectants testés.

Tableau 6 : Caractéristiques des préparations enzymatiques commerciales testées sur le biofilm.

Tableau 7 : Concentration des solutions enzymatiques initiales solubilisées en solvant stérile avant d'être déposées en microplaque.

Tableau 8 : Seuil d'efficacité (Concentration Minimale Inhibitrice) de quatre produits désinfectants sélectionnés contre sept bactéries pathogènes.

Tableau 9 : Seuil d'efficacité (Concentration Minimale Bactéricide) de quatre produits désinfectants sélectionnés contre sept bactéries pathogènes (- : pas d'action bactéricide).

Tableaux 10 : Le phénotype des sept bactéries testées pour les concentrations supérieures ou égales à la CMB des quatre désinfectants étudiés. Avec : (P1) : désinfectant P1; (P2) : désinfectant P2; (P3) : désinfectant P3; (P4) : désinfectant P4 ; (P) : planctonique ; (B) : biofilm ; (-) : bactérie absente ; (+) : bactérie présente. Dans le cas où la bactérie est présente à l'état planctonique cela indique que le désinfectant correspondant n'est pas bactéricide pour cette souche bactérienne.

Tableau 11 : Seuil d'efficacité (Concentration Minimale Inhibitrice) de quatre protéases et quatre glycosidases sélectionnées contre sept bactéries pathogènes.

Tableau 12 : La comparaison des cellules viables entre le biofilm nourri et celui à jeun de sept bactéries pathogènes.

Tableau 13 : Comparaison de la production des exopolysaccharides (EPS), les concentrations de protéines et de glucides des biofilms nourris et ceux à jeun de sept bactéries pathogènes.

Liste des figures

Figure 1 : Exemple de représentation d'une unité répétitive d'exopolysaccharide avec des substituants (●, ■, ▲) et une ramification liée en β -1,3.

Figure 2 : Structure chimique des monomères d'alginate issu de *Pseudomonas aeruginosa*: a) D-mannuronate, b) L-gulonate. Les groupes hydroxyyles en position 2- et 3- de l'unité mannuronate peuvent être partiellement acétylés (R=H ou COCH₃) (Evans et Linker, 1973).

Figure 3 : Unité répétitive d'un exopolysaccharide extrait d'une bactérie issue d'écosystèmes hydrothermaux profonds (Rougeaux et al., 1999).

Figure 4 : Modèle schématique représentant les différents stades de développement de biofilms microbiens (Islam et al, 2012).

Figure 5 : Biofilm constitué d'une souche de *P. aeruginosa* mobile (jaune) et d'une souche mutante ayant perdu sa mobilité (bleu), Barre: 20 μ m (Klausen et al. 2003).

Figure 6 : Biofilms et infections nosocomiales : pourquoi le traitement médical est souvent inefficace ? D'après (Utili, 2007), avec accord.

Figure 7 : La structure chimique des Ammoniums quaternaires.

Figure 8 : Triade catalytique de la subtilisine.

Figure 9 : Mécanisme d'action des protéases à sérine (X=O) et à cystéine (X=S).

Figure 10 : Représentation schématique d'un clivage enzymatique d'un hétéropolysaccharide, chaque couleur représentant un monosaccharide différent.

Figure 11 : Représentation schématique du protocole de formation du biofilm en microplaque révélé au cristal violet solubilisé dans l'éthanol-acétone.

Figure 12 : Plan de microplaque en vue de tester l'effet des enzymes et des produits désinfectants.

Figure 13 : Cinétique de formation du biofilm par *P. aeruginosa* P59 sur des coupons cylindriques de polyéthylène.

Figure 14 : Cinétique de formation du biofilm par *E. coli* E1525 sur des billes de verre et par *Salmonella* spp S3349 sur des billes d'inox.

Figure 15 : Cinétique de formation du biofilm sur le polystyrène par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17, et sur des coupons de cathéter par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogenès* P4.

Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du biofilm de sept souches bactériennes présentant trois secteurs différents (secteur agroalimentaire : présenté par *E. coli* E1525 sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 sur des billes d'inox ; secteur médical : présenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogenès* P4 sur des coupons de cathéter ; secteur environnemental : présenté par *P. aeruginosa* P59 sur des coupons cylindriques de polyéthylène) en fonction de la concentration pour les 4 produits testés. Chaque produit est présenté individuellement pour les sept souches étudiées. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du biofilm de sept souches bactériennes présentant les trois secteurs étudiés en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés.

Figure 18 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur des coupons cylindriques de polyéthylène en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement.

Figure 19 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *E. coli* E1523 développé sur des billes de verre en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement.

Figure 20 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur des billes d'inox en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement.

Figure 21 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. pyogenès* P4 développé sur des coupons de cathéter en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement.

Figure 22 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement.

Figure 23 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur le polystyrène en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement.

Figure 24 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. warneri* K9 développé sur le polystyrène en fonction de la concentration pour les 4 désinfectants testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement.

Figure 25 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur des coupons de tuyau de polyéthylène introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel

anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}) après 10, 20 et 30 min de traitement.

Figure 26 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *E. coli* E1523 développé sur des billes de verre introduits en microplaque.

Figure 27 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur des billes d'inox introduits en microplaque.

Figure 28 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. pyogènes* P4 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque.

Figure 29 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque.

Figure 30 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur une microplaque de polystyrène.

Figure 31 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. warneri* K9 développé sur une microplaque de polystyrène.

Figure 32 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre les biofilms de sept souches bactériennes présentant les trois secteurs étudiés. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}) après 30 min de traitement.

Figure 33 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur des coupons cylindriques de tuyau de polyéthylène introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination

de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}) après 10, 20 et 30 min de traitement. .

Figure 34 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm d'*E. coli* E1523 développé sur des billes de verre introduits en microplaque.

Figure 35 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur des billes d'inox introduits en microplaque.

Figure 36 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. pyogènes* P4 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque.

Figure 37 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque.

Figure 38 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur des microplaques en polyéthylène.

Figure 39 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. warneri* K9 développé sur des microplaques en polyéthylène.

Figure 40 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de sept souches bactériennes présentant les trois secteurs étudiés. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}) après 30 min de traitement.

Figure 41 : La croissance de sept souches bactériennes (*E. coli* E1525, *Salmonella* spp S3349, *Staphylococcus warneri* K9, *Staphylococcus sciuri* K17, *Staphylococcus aureus* K1, *Streptococcus pyogènes* P4 et *P.aeruginosa* P59) dans des conditions de milieu nutritif nourris et à jeun.

Introduction

Au cours des vingt dernières années, l'étude des populations microbiennes adhérentes sur des surfaces hydratées plutôt qu'en suspension a révolutionné la microbiologie. Dans leur environnement naturel, les microorganismes se développent majoritairement et préférentiellement sous forme de biofilms. Ce sont des associations denses et structurées de microorganismes entourées d'une matrice extracellulaire, qui se développent sur des surfaces inertes comme vivante. Ces organisations microbiennes permettent aux bactéries de se maintenir dans une niche écologique et de résister à de nombreux stress environnementaux tels que le pH, l'oxygène, la dessiccation et les composés bactéricides, grâce à la combinaison de différents mécanismes. Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans les domaines de la santé publique et de l'industrie générant des charges économiques importantes. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les maladies nosocomiales, les contaminations de produits alimentaires, la biodétérioration des matériaux (en particulier la biocorrosion), l'encrassement biologique des équipements industriels, etc...

Dans le but de contrôler le biofilm, des techniques physiques, chimiques ou biologiques sont utilisées. D'une manière générale, les méthodes de désinfection et de nettoyage sont les plus couramment utilisées pour lutter contre les biofilms négatifs. Ces méthodes restent pour la plupart des cas inefficaces pour détacher entièrement le biofilm de sa surface, et se révèlent moyennement efficace et peuvent engendrer une corrosivité pour le matériel, un danger potentiel pour les utilisateurs et l'environnement et une source de contamination critique. La législation envers l'utilisation de produits biocides est de plus en plus restrictive, la directive européenne relative aux biocides (98/8/CE) régleme leur mise sur le marché. Afin de lutter contre ce problème des procédures de nettoyages ou de prévention qui augmentent considérablement les coûts d'exploitation sont mises en place. Parmi les nouvelles voies de recherche, il existe la voie enzymatique qui permet le bio-traitement des surfaces. L'utilisation de bio-traitement des surfaces par voie enzymatique représente-elle une solution intéressante participant à l'amélioration de la qualité de désinfection? Si oui avec quelles limitations et quelles contraintes ?

Pour lutter à la fois contre l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm et dans le but de développer des produits anti-adhésion et anti-biofilm moins toxiques pour

l'environnement deux stratégies sont envisageables pendant notre étude pour lutter contre l'installation de ces nuisances :

- Une stratégie préventive agissant sur les mécanismes précoces de l'adhésion bactérienne,
- Une stratégie curative qui consiste à les éradiquer après leur installation.

Une grande attention doit donc être portée à ces deux types de stratégie puisqu'ils constituent un moyen préventif et curatif pour optimiser l'hygiène des surfaces colonisées ou colonisables, dans le respect de la réglementation internationale. Effectivement, notre étude s'inscrit dans ce cadre dont le but principale tout d'abord est d'atteindre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance de biofilms aux désinfectants à travers l'évaluation de l'effet anti-adhésion et anti-biofilm de préparations désinfectantes commerciales sur le biofilm, et par la suite, de prouver l'efficacité des enzymes utilisées dans le but de fragiliser la matrice d'EPS afin de désorganiser totalement l'architecture du biofilm pour enfin aboutir à sa destruction. Cette application des enzymes pourrait sans doute constituer un moyen abordable de bio-prévention et de bio-traitement des biofilms. Une fois le biofilm décroché de sa surface, les antimicrobiens peuvent pleinement agir et assurer une hygiène optimale des surfaces dans divers secteurs.

Un désinfectant est un produit chimique qui tue ou inactive des micro-organismes (tels les bactéries, virus et protozoaires) et les empêche de recoloniser les surfaces nettoyées (surfaces inertes tels le matériel médical, sols, murs, conduites d'eau, sièges, poignées de porte, brancards, intérieurs d'ambulance, etc). Dans le but de tester l'activité anti-adhésion et anti-biofilm, quatre produits commercialisés ont été sélectionnés en fonction de leurs principes actifs, de l'étude bibliographique sur la nature des produits les plus utilisés et aussi de leur disponibilité.

Les enzymes sont des protéines, catalyseurs de réactions de transformation qui se produisent dans les organismes vivants. Il existe plusieurs familles d'enzymes selon leur activité. Nous avons choisi de tester des hydrolases commerciales (protéases et glycosidases) du fait de leur disponibilité, leur biodégradabilité et leur moindre toxicité, qui seront étudiées dans le domaine des étapes initiales d'adhésion des biofilms, en prévention comme en nettoyage d'un biofilm dans divers secteurs, afin d'hydrolyser les molécules organiques (protéines et polysaccharides) impliquées dans les mécanismes de formation des biofilms ou les EPS présents dans la matrice extracellulaire et ainsi de perturber la formation et le développement du biofilm. A ce jour, bien que la présence de protéines, de polysaccharides et

de lipides ait été démontrée, à la fois sous forme de film primaire sur la surface (Baier, 1972 ; Loeb et Neihof, 1975 ; Taylor et al, 1997 ; Compère et al, 2001) mais aussi dans la matrice extracellulaire des biofilms (Allison, 2003), aucun composé organique n'a encore été totalement identifié concernant les biofilms. Le choix des protéases s'est donc porté sur des enzymes à large spectre de substrat. Les glycosidases étant spécifiques de la nature du sucre, de sa configuration D ou L, sa forme cyclique, l'anomérisation et la liaison (α ou β), des carbones impliqués dans cette liaison, mais aussi de la position et de la nature des substituants ainsi que de la conformation de la molécule. Une gamme de différentes activités glycosidases a donc été sélectionnée en fonction des sucres et des liaisons rencontrés le plus souvent dans la nature.

Plusieurs études s'intéressent à ce volet, l'ensemble des résultats obtenus suggèrent une spécificité d'activité anti-adhésion et anti-biofilm en fonction de l'espèce microbienne composant le biofilm et des conditions de son développement. En effet, la nature des protocoles d'essais entre les diverses études réalisées diffèrent en de nombreux points (nature du biofilm, nature de support colonisé, méthodes d'incubation des produits tests, quantification de l'inhibition du biofilm (dénombrements, mesures spectrophotométriques diverses selon le marqueur utilisé, calcul de surface de recouvrement, mesure de conductance ou d'épaisseur de biofilm, mesure de pression...)). Les études antérieures permettent de disposer d'un outil d'aide à la décision fiable, qui permettrait d'optimiser un choix de matériau au regard des propriétés de conditions du milieu industriel en agroalimentaire, médical et environnemental et de type bactérien à forte pathogénicité prédominant dans les secteurs sélectionnés et constituerait indéniablement un atout majeur pour traiter ce type de risque sanitaire.

Nous avons dans un premier temps voulu mettre au point un test modèle adapté aux milieux industriel, médical et environnemental permettant ainsi de cribler le potentiel de préparations désinfectantes et enzymatiques à prévenir la formation ou éliminer de biofilms déjà formés. Afin de déterminer jusqu'à quel point ce formalisme pouvait s'appliquer au phénomène d'inhibition et d'élimination de biofilm dans le cas des trois secteurs. Si la validité des modèles prédictifs qui découlent de cette approche était avérée, nous aurions alors la possibilité de simuler le comportement bactérien en biofilm pour un produit anti-adhésion et anti-biofilm donnée et un matériau particulier. Cette question pose de manière très directe la question du comportement bactérien en suspension pour ces mêmes produits antimicrobiens, en se souvenant qu'une bactérie à l'état planctonique est 1000 fois plus sensible que son

homologue à l'état biofilm. La question qui se pose donc, est-ce que le potentiel bactéricide d'un produit testé vis-à-vis de cellules planctoniques va inhiber l'adhésion et la formation de biofilms ? Il est donc logique que les paramètres de sensibilité bactériens en suspension aux produits désinfectants et enzymatique soient mis au point.

En vue d'une application dans les trois secteurs étudiés environnemental, médical et agro-alimentaire, le potentiel préventif (anti-adhésion) et curatif (anti-biofilm) des enzymes et désinfectants contre les biofilms, un test sur des biofilms modèles formés de manière reproductible aux trois secteurs étudiés et approprié au criblage d'un nombre important de molécules à différentes concentrations sera mis au point. Nous utiliserons pour cela sept bactéries modèles de l'adhésion sur des surfaces appropriées des trois secteurs sélectionnées pour leurs fortes capacités d'adhésion et de formation de biofilms. Le secteur agroalimentaire présenté par *Escherichia coli* E1525 développée sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 développée sur des billes d'inox ; le secteur médical présenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 développées sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogenes* P4 développées sur des coupons de cathéter ; le secteur environnemental présenté par *Pseudomonas aeruginosa* P59 développée sur des coupons cylindriques de polyéthylène. Les différents tests seront réalisés sur des microplaques en polystyrène, contenant les supports introduits dans les puits sur lesquels vont se développer le biofilm, afin de tester les produits dans les conditions les plus proches du milieu réactionnel permettant ainsi une présélection de produits efficaces dans les conditions de leur utilisation en tant qu'agent anti-adhésion et anti-biofilm.

Cependant, la reproductibilité des tests peut encore être améliorée en maîtrisant un dépôt homogène des suspensions bactériennes par puits. De même, il serait nécessaire d'augmenter l'efficacité du protocole de lavage en microplaque en maîtrisant le temps de traitement de produits testés sur le biofilm de la souche étudiée.

Nos travaux de thèse s'articulent autour de quatre axes portant :

- Dans un premier temps, sur le test d'évaluation de formation de biofilms modèles des trois secteurs étudiés qui sera mis au point.
- Dans une seconde étape, sur les tests d'évaluation du potentiel préventif et curatif des désinfectants qui seront mis au point.
- Dans une troisième étape et afin de comparer l'effet des désinfectants avec celui des enzymes, nous allons caractériser les activités spécifiques de chaque préparation enzymatique commerciale, dans les conditions les plus proches des secteurs étudiés.

➤ Enfin, une étude sur les molécules excrétées (EPS) par nos bactéries modèles permettra également une meilleure compréhension des mécanismes impliqués.

Les résultats issus de chaque technique seront comparés et discutés. Toute différence relevée sera discutée afin de mieux cerner la spécificité de l'information apportée par chacune des techniques utilisées.

La maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau potable et des aliments, la maîtrise aussi de la qualité d'hospitalisation et des soins médicaux, en prévenant la formation de biofilm ou en l'éradiquant, aura nécessairement des retombées socio-économiques positives, que ce soit au niveau de la mise en conformité vis-à-vis de la réglementation ou de la protection de la santé publique. Elle doit tendre également à réduire les coûts d'investissement et d'exploitation, notamment en prévenant (ou réduisant) les phénomènes de corrosion qui entraînent des surcoûts très significatifs estimés à environ 4% du PIB des pays industrialisés : 28 milliards d'euros pour la France, 10% de ce coût étant dus à la bio-corrosion. Au Maroc, une étude de la COMACAC (Confédération marocaine pour la certification en anticorrosion) estime la charge de la lutte contre la corrosion à 5% du PIB national.

Nous espérons enfin que les résultats issus de ce travail de thèse pourront être d'utilité dans les trois secteurs concernés par les phénomènes de bioadhésion (industrie agroalimentaire, domaine médicale...) et pour la recherche de solutions adaptées, face aux problèmes liés à la résistance du biofilm aux désinfectants, l'utilisation des procédés enzymatiques permettant une dégradation naturelle de la matrice du biofilm participant ainsi à l'amélioration de la qualité de désinfection. D'ailleurs, les enzymes sélectionnées vont agir spécifiquement sur les polymères qui constituent la structure du biofilm, les détruisent et parviennent à arracher le biofilm de sa surface. Une fois le biofilm décroché de sa surface, les antimicrobiens peuvent pleinement agir et assurer une hygiène optimale de la surface.

Chapitre I - Etude bibliographique

1. Biofilms

1.1. Structure des biofilms

Dans les conditions naturelles, les bactéries existent sous deux formes (Van Gestel et al, 2014) :

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

Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe. La forme planctonique permet aux bactéries de proliférer et de coloniser de nouvelles niches. C'est la forme minoritaire. Brièvement, des bactéries sous forme libre s'attachent à une surface de façon irréversible, puis croissent. Ces bactéries produisent et accumulent des polymères extracellulaires, formant une matrice extracellulaire à forte teneur en eau. Les bactéries sont immobilisées au sein de cette matrice. Leur proximité entre elles leur permet de réaliser des échanges de signaux et de nutriments. C'est cet ensemble qui forme le biofilm (Clutterbuck et al, 2007).

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

1.1.1 Grande diversité de biofilms

Le terme de biofilm pourrait laisser entendre qu'il s'agit d'une simple couche de microorganismes déposée sur une surface. Les biofilms sont très hétérogènes, dans le temps et dans l'espace. Ils sont constamment remodelés, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes (Kovács, 2014 ; Tolker-Nielsen et Molin, 2000). Ils présentent une grande diversité aussi bien au niveau structural (une ou plusieurs espèces de microorganismes au sein du biofilm, épaisseurs diverses) qu'au niveau des supports colonisés.

Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de microorganismes : On parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes (Tolker-Nielsen et Molin, 2000). La plupart des biofilms rencontrés sont hétérogènes. La présence d'une espèce de microorganisme ou d'une autre au sein du biofilm dépend des conditions environnementales. Par exemple, les biofilms éclairés par la lumière du soleil sont composés majoritairement d'organismes phototrophes, comme les algues ou les cyanobactéries, réalisant la photosynthèse et produisant leur biomasse à partir de carbone minéral. Les biofilms formés en absence de lumière sont constitués principalement de bactéries hétérotrophes et chimiotrophes (Wanner et Bauchrowitz, 2006).

Les biofilms peuvent se former sur des surfaces, biologiques ou inertes, d'une grande diversité : tissus vivants, appareillage médical (sonde, cathéter, broches...), système de canalisation industriel ou d'eau potable, surfaces immergées... Les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm. Selon le type de support sur lequel se forme le biofilm, l'organisation structurale de ce dernier sera différente. Un biofilm fixé dans la lumière d'une canalisation a une structure très complexe, et contient divers composants : produits issus de réactions de corrosion, boue, algues unicellulaires et bactéries filamenteuses. Un biofilm formé à la surface d'un cathéter a une organisation plus simple : on distingue des micro-colonies de coques associées à une matrice d'exopolymères (Donlan et Costerton, 2002).

Tous les biofilms n'ont pas la même épaisseur. Les biofilms des eaux naturelles oligotrophes sont plus fins que ceux des milieux aqueux riches comme la plaque dentaire ou les cathéters (Bury-Moné, 2007). Les biofilms récemment formés sont souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens qui sont stratifiés (Bury-Moné, 2007).

L'architecture du biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms. De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes (Nadell et Bassler, 2011).

1.1.2 Organisation structurale commune

Les biofilms sont hétérogènes d'un point de vue structural. Ils se forment sur des supports variés, ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de microorganismes. De cette diversité on peut néanmoins dégager certaines caractéristiques structurales communes à tous les biofilms. Un biofilm est constituée d'une fine monocouche

de cellules à sa base (fixées à la surface du substrat), surmontée de plusieurs couches épaisses de cellules enfermées dans une matrice et reliées par des canaux aqueux. Il s'agit d'une organisation spatiale stratifiée, permettant des échanges (informations, nutriments...) et une coopération entre microorganismes (Kovács, 2014 ; Tolker-Nielsen et Molin, 2000).

La **couche la plus profonde du biofilm** est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente. La **couche superficielle du biofilm** est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide. Entre ces deux couches de cellules, on trouve des cellules en micro-aérobiose (Klausen et al. 2003).

L'organisation stratifiée des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments, d'ions... Les nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grande quantité dans les couches superficielles du biofilm. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses. Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des microorganismes (Bury-Moné, 2007). Des simulations tridimensionnelles réalisées par informatique ont permis de montrer que les zones de croissance rapide du biofilm sont caractérisées par la présence de larges structures en colonnes contrairement aux zones de croissance réduite où l'on trouve un réseau étroit de structures entraînant ainsi une réduction des communications intercellulaires et de la croissance du biofilm (Clutterbuck et al, 2007, Van Gestel et al, 2014).

Au sein du biofilm, les microorganismes morts ou lysés sont réutilisés comme nutriments : on parle de « cannibalisme » (Kovács, 2014). L'ADN libéré lors de la mort programmée de certains microorganismes du biofilm aurait un rôle structural dans la stabilité des biofilms (Bury-Moné, 2007).

1.1.3 Principaux constituants du biofilm

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les microorganismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. L'eau est leur principal composant, ce qui explique leur propriété hydrophile. La présence de canaux et de pores permet des flux d'eau, d'ions et de nutriments (Van Gestel et al, 2014).

Les microorganismes représentent 2 à 15% du matériel du biofilm. La matrice extracellulaire représente 50 à 90% de la masse organique carbonée d'un biofilm. Le rapport C/N d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant

dû à la prédominance de la matrice (Bury-Moné, 2007). La matrice est composée essentiellement d'eau (97%) et de substances polymériques extracellulaires (EPS) majoritairement constituées de polysaccharides, mais aussi de protéines, lipides, acides nucléiques et substances humiques (Wingender et al, 1999). La proportion des EPS peut varier de 50 à 90% de la matière organique totale du biofilm (Christensen et Characklis, 1990). Le Tableau 1 ci-dessous représente des données concernant la composition des EPS issues de différents systèmes naturels et techniques (Flemming et Wingender, 2001).

Tableau 1 : Composition des EPS d'après Flemming et Wingender, 2001.

Composé	Quantité présente dans les EPS
Polysaccharides	40-95%
Protéines	< 1-60%
Acides nucléiques	< 1-10%
Lipides	< 1-40%

La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural important, et explique certains avantages permis par le mode de vie sessile, notamment la protection des microorganismes contre les facteurs environnementaux et d'autres propriétés comme la résistance aux agents bactéricides. Elle facilite l'arrangement des cellules au sein du biofilm et la communication intercellulaire, notamment en concentrant des molécules signal nécessaires au développement du biofilm (Allison, 2003 ; Jiao et al, 2010). Les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolysaccharides sont variables d'un biofilm à l'autre. Elle est toujours initialement composée de polysaccharides. Sa très forte teneur en eau, dû à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel. Parfois, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001). La matrice d'exopolysaccharides joue aussi un rôle mineur dans les propriétés d'antibiorésistance des biofilms en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (Donlan et Costerton, 2002). Ainsi, la matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert

de barrière protectrice contre la dessiccation, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages (Donlan et Costerton, 2002).

La composition de la matrice est aujourd'hui mieux connue, cependant, la nature exacte des constituants de cette matrice ne l'est pas. La nature des EPS dépend largement des différentes méthodes expérimentales utilisées pour les isoler (De Alexandre Sebastião et al, 2013). En effet, à ce jour, pour la déterminer il est nécessaire de purifier et d'extraire les EPS issues de biofilms. Ce processus expérimental est complexe. C'est pourquoi la plupart des EPS caractérisées l'ont été à partir de monocultures de bactéries planctoniques et peu à partir de biofilms véritablement. Il est connu aujourd'hui que selon la nature des microorganismes constituant le biofilm et les conditions environnementales (pH, salinité, température), la composition de la matrice change, d'un point de vue biochimique et physico-chimique. De plus, les conditions de culture de bactéries en laboratoire, notamment en milieu nutritif riche, sont très différentes de celle d'un biofilm naturel. Cependant, il n'est pas certain que physiologiquement une même bactérie planctonique excrète un polymère de nature différente de celui excrété au sein d'un biofilm (Sutherland, 1999).

1.1.3.1 Exopolysaccharides

Les composés de la matrice extracellulaire les plus étudiés sont les exopolysaccharides. Le fait que des bactéries produisent des exopolysaccharides est connu et étudié depuis longtemps. On distingue les polysaccharides capsulaires et les exopolysaccharides. La distinction entre les deux est due au fait qu'après une culture liquide de bactéries, les cellules étant récoltées par centrifugation, on peut observer les exopolysaccharides dans le surnageant et les polysaccharides capsulaires dans le culot cellulaire. L'acide colanique est un exopolysaccharide impliqué dans l'architecture des biofilms d'*Escherichia coli* permettant la formation d'un biofilm volumineux (Pringent-Combaret et al, 2000). Cependant, la majorité des EPS impliquées dans les biofilms et décrites dans la littérature sont extracellulaires.

Chimiquement parlant, les exopolysaccharides sont très hétérogènes et de haute masse molaire (Zhang et al, 2014). Ils sont constitués de différents oses, pouvant posséder des fonctions organiques comme la fonction alcool, amine ou acide, ou des substituants inorganiques (sulfate, phosphate). Les oses sont liés entre eux par différentes liaisons possibles selon le carbone impliqué dans la liaison ainsi que l'anométrie α ou β de celle-ci (Figure 1). Ils peuvent présenter des unités répétitives plus ou moins longues, des

ramifications de chaînes mais ça peut être également des monopolysaccharides, constitués d'un seul type de monosaccharide.

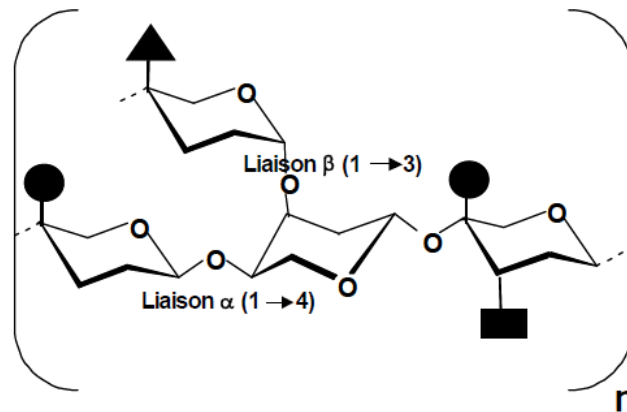


Figure 1 : Exemple de représentation d'une unité répétitive d'exopolysaccharide avec des substituants (●, ■, ▲) et une ramification liée en β -1,3.

Les principaux sucres composant les exopolysaccharides bactériens sont les suivants (Kenne et Lindberg, 1983) :

- Pentose : D-ribose
- Hexoses : D-glucose, D-galactose et D-mannose
- 6-déoxy-L-mannose : L-rhamnose
- Acides uroniques : acide glucuronique et acide galacturonique
- Hexosamines : D-galactosamine et D-glucosamine

Le polysaccharide le plus connu et le plus répandu dans la nature est la cellulose. C'est un homopolymère de D-glucoses liés en β -1,4. Chez les bactéries, elle est exclusivement extracellulaire.

La plus connue des EPS issue d'une souche formant des biofilms est l'alginate. Il a été caractérisé à partir de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette molécule est connue pour être également sécrétée par certaines algues brunes. C'est un copolymère linéaire, non branché et de haute masse molaire, d'acides uroniques tels que le D-mannuronate (M) et L-guluronate (G) liés entre eux par des liaisons β -1,4 (Figure 2) (Evans et Linker, 1973). Ils peuvent être organisés en une succession de blocs d'homopolymères, (MMM) ou (GGG), ou bien en blocs d'hétéropolymères (MGMG). Les alginates bactériens sont souvent O-acétylés sur le résidu β -D-mannuronate (Schürks et al, 2002).

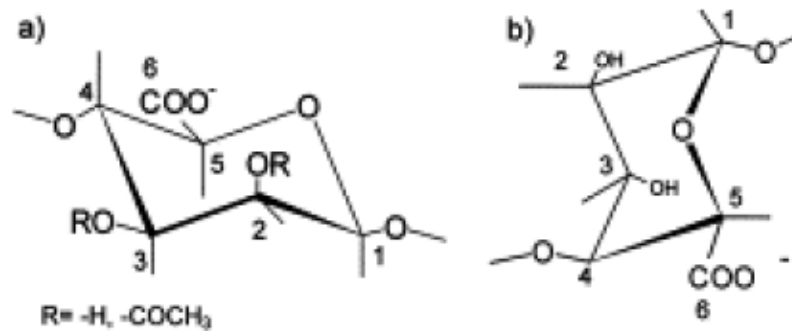


Figure 2 : Structure chimique des monomères d'alginate issu de *Pseudomonas aeruginosa*: a) D-mannuronate, b) L-guluronate. Les groupes hydroxyles en position 2- et 3- de l'unité mannuronate peuvent être partiellement acétylés ($R=H$ ou $COCH_3$) (Evans et Linker, 1973).

Bien que l'alginate soit l'EPS la plus connue et la plus étudiée des biofilms, il n'est pas représentatif des EPS issues de biofilm en général. En effet, il est composé d'oses acides alors que la plupart des EPS sont composées majoritairement d'oses neutres.

Les polysaccharides de biofilms dentaires de différents microorganismes du genre *Streptococcus* sont bien caractérisés. Il s'agit d'homopolymères de glucanes de type dextrans ou d'homopolymères de fructanes de type levane. Les dextrans sont constitués de résidus D-glucose liés en α -1,3 et α -1,6, les levanes des résidus D-fructoses liés en β -2,6 (Birkhed et al, 1979).

Des études sont réalisées sur les exopolysaccharides produits par les bactéries marines en général car ils présentent un fort potentiel en tant qu'agent chélateur, gélifiant, émulsifiant ou encore en thérapeutique humaine (Colliec-Jouault et al, 2004). Les bactéries marines sont connues pour produire des hétéropolysaccharides variés et de haute masse molaire. Leur structure est caractérisée et leur composition varie selon la souche productrice ; ils peuvent être plus ou moins sulfatés, aminés et acétylés et peuvent posséder une quantité importante d'oses acides. Un exemple d'exopolysaccharide issu de bactéries d'écosystèmes hydrothermaux profonds est représenté dans la Figure 3 (Rougeaux et al, 1999).

→3)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-α-D-GalpNAc(1→

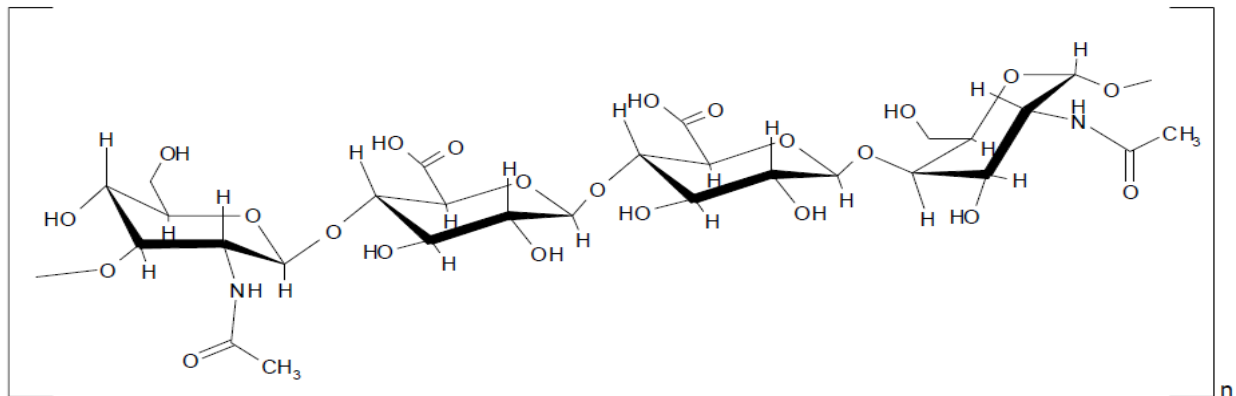


Figure 3 : Unité répétitive d'un exopolysaccharide extrait d'une bactérie issue d'écosystèmes hydrothermaux profonds (Rougeaux et al, 1999).

1.1.3.2 Protéines

Bien que leur présence soit démontrée, peu de données sont publiées concernant la nature des protéines au sein de la matrice de polymères. Nielsen et Jahn en 1999 décrivent une accumulation de protéines au sein de la matrice extracellulaire d'un biofilm de *Pseudomonas putida*. Une analyse en AFM (microscopie à force atomique) couplée à une étude du comportement d'adhésion de *Azospirillum brasilense* sur une surface en polystyrène suggère l'implication d'EPS de nature protéique (van der Aa et Dufrêne, 2002). De même, une étude en spectroscopie ATR-FTIR montre la présence de protéines et de polysaccharides au sein d'un biofilm de *Streptococcus pneumonia* (Donlan et al, 2004). Des protéines issues des EPS de biofilms dentaires ont été caractérisées comme des enzymes impliquées dans la synthèse des exopolysaccharides (Welin et al, 2004). Flemming décrit chez les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* une masse de protéines représentant plus de 30% de la masse des EPS ; ces protéines seraient de faible masse molaire (5 à 150 kDa) et à forte activité protéase (Flemming et Wingender, 2001). Une autre étude montre chez les biofilms de *Pseudomonas fluorescens* une masse de protéines plus importante que celle des exopolysaccharides (Molobela et al, 2010).

1.1.3.3 Lipides

Bien que leur présence soit démontrée, peu d'études sont réalisées sur les lipides issus de la matrice. Les lipides regroupent les acides gras et leur forme estérifiée (phospholipides, glycérides, glycolipides, sulfolipides) (Arantxa, 2014). Les lipides les plus connus chez les bactéries sont les lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines, constituant la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il s'agit d'un noyau glycérol lié à un acide gras via une liaison

ester et à un polysaccharide via une liaison phosphate ester. La composition de surface des LPS des bactéries interfère notamment dans le phénomène d'adsorption.

La présence de rhamnolipides a été démontrée chez certains biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Davey et al, 2003). Ils joueraient un rôle dans le maintien de la structure tridimensionnelle du biofilm. Des homosérines lactones, aux chaînes d'acides gras plus ou moins longues, sont également présentes chez les biofilms de bactéries à Gram négatif (Fuqua et Greenberg, 2002 ; Zhang et al, 2014) et sont impliquées dans la formation de macrocolonies.

1.2. Méthodes d'étude des biofilms

La standardisation des méthodes d'étude des biofilms est nécessaire. Elle se fait selon un certain nombre de critères (McLean, 2004).

1.2.1 Choix des micro-organismes

Le choix des microorganismes utilisés pour étudier la formation de biofilms repose sur plusieurs critères (McLean, 2004) :

- Capacité inhérente des microorganismes à former des biofilms,
- Conditions de culture des microorganismes (pH, température, lumière, nutriments, oxygène...),
- Stabilité génétique,
- Stabilité physiologique,
- Cinétique de formation du biofilm,
- Contamination.

Des études ont été réalisées avec une grande variété de micro-organismes. On peut citer entre autres : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus spp*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium spp*....

1.2.2 Monoculture et polyculture : meilleur reflet de la réalité biologique

La grande majorité des études sur les biofilms sont réalisées en monoculture, c'est-à dire qu'on étudie des biofilms formés d'une seule espèce de micro-organismes. L'avantage de la monoculture est que l'on peut plus facilement identifier des mutations survenues lors du changement de l'aspect des colonies (McLean, 2004). Néanmoins, dans la nature, les microorganismes sous forme de biofilms sont rarement trouvés sous forme de culture pure ;

les biofilms hétérogènes composés de plusieurs espèces de microorganismes sont prédominantes. D'où l'existence d'une seconde méthode d'étude, plus complexe à mettre en œuvre mais plus proche de la réalité biologique : la polyculture (McLean, 2004). Certaines colonies de microorganismes sont pigmentées, il est donc facile de les identifier lors de polycultures. Sinon, on peut identifier les espèces microbiennes par les techniques du génie génétique (on met une sonde d'ADN spécifique d'une bactérie et l'hybridation *in situ* permettra d'identifier la bactérie concernée par fluorescence).

Les biofilms hétérogènes sont le siège d'un grand nombre d'interactions entre microorganismes: actions synergiques, actions négatives (compétition, parasitisme, prédation...).

Lorsque les populations bactériennes atteignent un certain équilibre au sein du biofilm, seul un petit nombre d'espèces bactériennes prédomine. Les organismes prédominants au sein des biofilms ne sont pas nécessairement les mêmes qui prédominent sous forme planctonique. Ainsi, les études en laboratoire permettent d'évaluer quelles sont les espèces bactériennes qui deviennent prédominantes lors du changement des conditions environnementales (McLean, 2004).

1.2.3 Différentes méthodes d'obtention des biofilms

Des chercheurs ont développé différents modèles de biofilms artificiels, reproductibles d'un laboratoire à un autre (Lemon, 2008). Les cuves à flux continu sont de petites chambres à parois transparentes dans lesquelles des biofilms submergés peuvent se former et sont continuellement approvisionnés en nutriments. Comme l'indique le nom de la technique, les biofilms sont dans un milieu aqueux, caractérisé par un flux de liquide, dont la vitesse est constante. Les biofilms formés dans ces cuves à flux continu peuvent être facilement observés avec les techniques de microscopie confocale à balayage laser : on obtient ainsi des images de biofilms à tous leurs stades de développement. On peut observer des images de biofilms avec une structure « bourgeonnante » caractéristique, en forme de champignons séparés par des canaux aqueux.

On peut aussi réaliser des cultures en lots, en absence de flux. Cette technique consiste à mettre des bactéries en culture dans des plaques de micro-titrage, sans flux. Avec ce système, on peut analyser rapidement de nombreux échantillons. Cette méthode d'étude est utilisée en vue du séquençage des génomes des micro-organismes, de même que la technique d'analyse de pellicules flottant à l'interface air-liquide. Elle consiste à recueillir des biofilms formés au

niveau d'une interface liquide-air et de les analyser. Enfin, on peut obtenir des biofilms sous forme de colonies formées à la surface de milieux gélosés.

La plupart des souches bactériennes utilisées en laboratoire produisent des biofilms fragiles comparativement aux souches sauvages des mêmes espèces bactériennes. Les souches auraient accumulé des mutations au fil des années lors des expériences de culture en laboratoire et auraient subi en quelque sorte une domestication (Branda, 2001).

1.3. Formation et écologie des biofilms

La formation d'un biofilm représente un changement radical du mode de vie des microorganismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile, est un processus dynamique et complexe. Il est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un changement de phénotypes des microorganismes concernés : les mêmes individus ne possèdent plus les mêmes propriétés ni les mêmes fonctions (Nadell et Bassler, 2011). L'environnement particulier du biofilm permet aux cellules de **coopérer** et d'interagir de manière différente que sous forme planctonique. Ainsi, les bactéries vivant en biofilm ont des propriétés sensiblement différentes de celles des bactéries planctoniques de la même espèce. L'activation de nombreux groupes de gènes en quelques minutes régule cette permutation de mode de vie (Costerton et al, 1999). Les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie commencent tout juste à être identifiés et compris (Goller, 2008). Les microorganismes d'un biofilm disposent de mécanismes originaux pour s'attacher de façon réversible à une surface, y adhérer et former une communauté. Un véritable écosystème va se former, puis se détacher sous l'influence de divers facteurs environnementaux (Donlan et Costerton, 2002).

Les moyens utilisés par les bactéries pour former des biofilms diffèrent selon les espèces considérées, mais on peut définir trois propriétés communes à tous les biofilms (Lemon, 2008 ; Goller, 2008) :

- Les cellules constituant le biofilm sont reliées entre elles par une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques,
- Le développement d'un biofilm est sous l'influence de signaux extracellulaires (environnementaux) et cellulaires (quorum sensing)
- Le biofilm protège les bactéries qui le constituent de l'action des agents antimicrobiens, des défenses immunitaires de l'hôte et d'éventuels prédateurs.

On va tout d'abord s'intéresser aux différentes étapes de formation d'un biofilm.

1.3.1 Etapes de formation d'un biofilm

On distingue quatre étapes dans le mécanisme de formation des biofilms (Islam et al, 2012) (Figure 4). Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon réversible par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals ; on parle d'adhérence (Golovlev, 2002 ; Van Houdt et Michiels, 2005). Puis, les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme par exemple les pili, et synthétisent une matrice d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'adhésion. On distingue ensuite, des phases de croissance et de maturation du biofilm. Enfin, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm, et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle d'essaimage du biofilm (Clutterbuck et al, 2007).



Figure 4 : Modèle schématique représentant les différents stades de développement de biofilms microbiens (Islam et al, 2012).

1.3.2 Attachement primaire réversible et non spécifique à une surface (adhérence)

L'interface solide-liquide entre une surface et un milieu aqueux (eau, sang par exemple), fournit un environnement idéal pour la fixation de microorganismes et la formation d'un biofilm. Dans un environnement liquide, les bactéries sont soumises à des forces hydrodynamiques lorsqu'elles s'approchent d'une surface (Islam et al, 2012). Les bactéries ont développé des mécanismes de motilité active afin de contrer les forces répulsives et

électrostatiques rencontrées au voisinage des surfaces sur lesquelles elles se fixent. Par exemple, les bactéries Gram-négatives, comme *Escherichia coli* ou *Salmonella*, possèdent des flagelles. Ces derniers leur permettent d'entrer en contact avec une surface puis de s'y fixer (Goller, 2008). Cependant, la motilité flagellaire n'est pas essentielle pour l'attachement initial et la formation d'un biofilm. L'absence de flagelle est compensée par l'existence d'autres molécules adhésives, comme les curli, permettant l'attachement de la bactérie à la surface (Beloin et al, 2008). Certaines bactéries sont capables d'établir un contact avec une surface par des mécanismes de signalisation et d'exprimer par la suite des adhésines à leur surface (Wang et al, 2004). Ce mécanisme est appelé « surface sensing ». Il existe chez *Escherichia coli*, (système de signalisation Cpx) mais les modes de fonctionnement ne sont pas encore connus (Goller, 2008). Les gènes codant pour les caractères de motilité (synthèse du flagelle, motilité, chimiotactisme...) sont inhibés une fois que les bactéries se sont fixées à la surface (Prigent-Combaret et al, 1999). L'attachement primaire à une surface est sous l'influence de nombreux facteurs : pH, osmolarité du milieu, température... (Beloin et al, 2008). Il est suivi par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface.

1.3.3 Attachement secondaire irréversible et spécifique à une surface (*adhésion*)

- **Mécanismes d'adhésion**

L'adhésion correspond à une fixation active et spécifique des microorganismes sur une surface (Islam et al, 2012). Les structures d'adhésion varient selon les types de microorganismes concernés. Pour les bactéries Gram-négatives, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries Gram-positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivant presque uniquement fixées (comme par exemple *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*) utilisent des structures spécifiques comme le pédoncule ou la gaine (Van Houdt et Michiels, 2005).

Ces molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts cellule- surface et des contacts cellule-cellule (Lemon, 2008). Chez certaines souches de *Streptocoques*, des protéines exprimées à la surface des bactéries, entre autres la protéine Bap, favorisent les contacts entre cellules et contribuent à la synthèse de la matrice extracellulaire (Lasa et Penadés, 2006).

- **Molécules impliquées**

Le fimbriae de type I, ou les pili, sont rencontrés chez la plupart des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Citrobacter* et *Enterobacter* par exemple). Ils interviennent dans la colonisation de tissus vivants et dans la formation de biofilms (Islam

et al, 2012). La protéine adhésive FimH exprimée par les fimbriae de type I peut se lier à des glycoprotéines, comme par exemple, les uroplakines des cellules uroépithéliales vésicales, les IgA ou encore les mucines pulmonaires et intestinales. La production de fimbriae de type I est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules et les conditions environnementales (Goller, 2008). Les bactéries exprimant ce type d'organelles en expriment en moyenne 100 à 500 à leur surface (Beloin et al, 2008).

Les curli sont des fibres protéiques extracellulaires produites par des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*. Les curli peuvent se fixer à des protéines de la matrice extracellulaire des cellules de l'hôte : fibronectine, laminine, plasminogène. Leur synthèse est sous l'influence de nombreuses conditions environnementales comme la température, l'osmolarité, le pH et les concentrations en oxygène (Beloin et al, 2008). Les curli ont un rôle dans l'adhésion et la colonisation d'une surface et la formation de biofilms (Vidal et al, 1998). L'aptitude de souches environnementales d'*Escherichia coli* à former des biofilms dépend de leur capacité à exprimer des curli à leur surface (Castonguay et al, 2006 ; Goller, 2008).

Les pili de conjugaison interviennent lors du contact initial avec la surface et lors de la phase de maturation du biofilm (Proft et Baker, 2009). Ils joueraient un rôle de stabilisation dans la structure du biofilm (Beloin et al, 2008). L'utilisation des pili de conjugaison met un terme à une mobilité désorganisée des bactéries et permet des interactions stables. Dès lors, l'attachement devient irréversible (O'Toole et Kolter, 1998). Certaines bactéries expriment à leur surface des molécules spécifiques intervenant lors de leur fixation à un substrat, différentes des molécules d'adhésion fréquemment rencontrées et citées précédemment. Prenons l'exemple des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infections du tractus urinaires suite à la colonisation de sondes urinaires. Soixante pour-cent des souches uropathogènes d'*Escherichia coli* expriment à leur surface une adhésine appelée Ag43. Il s'agit d'un facteur protéique intervenant dans les phénomènes d'auto-agrégation cellulaire. Cet épitope confère aux bactéries qui en sont porteuses la capacité de « s'auto-agrégéer ». Ag43 intervient dans les contacts cellule-substrat et cellule-cellule et est exprimée de façon importante durant le mode de vie sous forme de biofilms (Schembri et al, 2003).

1.3.4 Phases précoces de développement du biofilm. Maturation du biofilm

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation (Islam et al, 2012). La maturation du biofilm est divisée en deux phases (Clutterbuck et al, 2007). La première phase est marquée par des régulations de gènes

importantes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques (Van Gestel et al, 2014). Elles concernent essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies ; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support (Sauer et al, 2002). La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm. L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (Clutterbuck et al, 2007). Soixante-dix gènes subiraient des modifications au cours de la maturation d'un biofilm (Whiteley et al, 2001).

1.3.5 Evolution et plasticité du biofilm

Face à une modification de leur environnement, les bactéries ont besoin de coordonner la réponse de l'ensemble de la population présente en modifiant l'expression d'un grand nombre de gènes. La découverte de signaux de communication extracellulaires sécrétés par de nombreuses espèces bactériennes est récente. Comme dans des organismes supérieurs, l'information fournie par ces molécules est critique pour synchroniser les activités de grands groupes de cellules. Dans les bactéries, la communication chimique implique de produire, libérer, détecter, et répondre à ces signaux (Zhang et al, 2014). Ce processus, nommé quorum sensing (QS), permet à des bactéries de surveiller l'environnement, notamment la présence d'autres bactéries, et de modifier leur comportement à l'échelle de la population en réponse aux changements (Kovács, 2014). La plupart des processus contrôlés par le quorum sensing sont improductifs une fois entrepris par une bactérie individuelle agissant seule, mais deviennent efficaces une fois mis en jeu simultanément par un grand nombre de cellules.

Le biofilm n'est pas une structure figée: plusieurs études montrent que les bactéries peuvent s'y déplacer. Stoodley et al. (1994) ont observé en microscopie confocale, un biofilm polymicrobien soumis à un régime turbulent ($Re > 1400$): ils ont démontré que des microcolonies se déplaçaient à une vitesse maximale de $800 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ à la surface du biofilm. Le même type d'observation a été fait par Rice et al. (2003) sur un biofilm de *P. aeruginosa*, sous un régime d'écoulement laminaire ($Re=5$). Certaines cellules métaboliquement plus actives migraient à une vitesse de $1,5 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$. L'étude de Klausen et al. (2003) a consisté à cultiver des biofilms composés de deux souches de *P. aeruginosa*: la souche sauvage mobile et un mutant pour les pili de type IV ayant perdu sa motilité. Des structures particulières, de type "champignon", se sont développées: la base de la structure était constituée de bactéries immobiles tandis que le chapeau était constitué de bactéries mobiles (Figure 5).

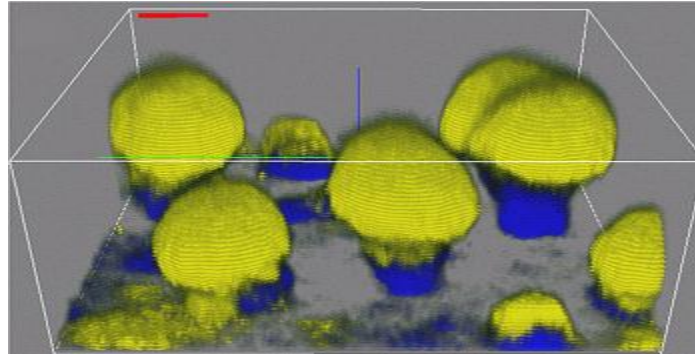


Figure 5 : Biofilm constitué d'une souche de *P. aeruginosa* mobile (jaune) et d'une souche mutante ayant perdu sa mobilité (bleu), Barre: 20 μm (Klausen et al. 2003)

L'échange de matériel génétique entre espèces au sein du biofilm est également fréquent (Proft et Baker, 2009). Il contribuerait à la stabilisation du biofilm (Molin et Tolker-Nielsen, 2003) et à la diffusion de la résistance aux traitements antibiotiques ou de désinfection (Branda et al, 2005 ; Schwartz et al, 2003a et b). Le transfert conjuguatif de plasmide a été étudié dans plusieurs types de biofilms simples, généralement composés de quelques espèces seulement. Ce type de transfert nécessitant un contact entre les cellules donneuses et réceptrices, son efficacité dépendrait du rapport surface/volume (Molin et Tolker-Nielsen, 2003). Il pourrait donc intervenir lors des étapes précoces de la formation du biofilm (Licht et al, 1999), tandis que dans le cas de structures matures, la conjugaison n'aurait lieu qu'avec les cellules de la couche extérieure du biofilm (Haagensen et al, 2007).

L'autre mécanisme d'acquisition de matériel génétique (ADN chromosomique ou plasmidique) est la transformation, qui a lieu chez des bactéries compétentes. L'induction de cet état de compétence peut avoir lieu chez la plupart des espèces bactériennes et s'accompagne généralement d'une lyse d'une partie de la population et d'une libération d'ADN (Steinmoen et al, 2002). Le taux de transfert le plus élevé est obtenu avec des biofilms jeunes dans lesquels les cellules se multiplient activement, et avec des concentrations d'ADN transformant élevées. La présence de cellules dans la phase planctonique aurait un impact négatif sur le taux de transfert.

1.3.6 Essaimage et dispersion du biofilm

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion : des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm (Islam et al, 2012). Des remaniements génétiques sont à l'origine du détachement des formes planctoniques. Ce dernier permet non

seulement de promouvoir une diversité génétique mais aussi de favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms (Clutterbuck et al, 2007). La libération des formes planctoniques à partir du biofilm peut se faire selon deux modalités (Christensen et Characklis, 1990). Les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités, on parle d' « érosion » du biofilm. Mais on peut assister à un détachement massif et rapide, « en lambeaux », de quantités importantes de bactéries, appelé « sloughing ». Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance. En effet, les bactéries planctoniques essaimant d'un biofilm sont capables de résister aux défenses immunes de l'hôte et être à l'origine d'une infection (Donlan et Costerton, 2002). Par exemple, les bactéries planctoniques qui essaient à partir de prothèses et d'implants médicaux sont capables de survivre à la phagocytose réalisée par les polynucléaires neutrophiles et d'engendrer une infection systémique (Clutterbuck et al, 2007).

1.3.7 Ecologie des biofilms

On distingue différents types d'interactions qui ont des effets positifs ou négatifs pour les membres de la communauté bactérienne. On peut citer comme exemple bénéfique la coopération dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes, ou encore la production d'enzymes profitables à l'ensemble de la communauté de microorganismes (Tomlin et al, 2005). A l'opposé, les différentes colonies de microorganismes occupant une même niche écologique entrent en compétition pour l'acquisition des ressources se trouvant dans le milieu (Proft et Baker, 2009). Deux mécanismes de compétition entre bactéries : la production de bactériocines et la baisse du pH (Irie et Parsek, 2008).

Les biofilms ont une architecture complexe et irrégulière, en forme de coraux ou de champignons. Cette architecture n'est pas figée: les microorganismes bougent à partir du lieu de leurs premières divisions cellulaires : il y a une véritable dynamique interne au sein des biofilms (Clutterbuck et al, 2007 ; Van Gestel et al, 2014). Les microcolonies de bactéries sont imbriquées au sein d'une matrice d'exopolymères contenant des canaux aqueux et des pores, permettant des échanges d'eau, de nutriments, de déchets, mais aussi d'informations et de caractères transmissibles génétiquement (caractères de résistance aux antibiotiques par exemple) (Blankenship et Mitchell, 2006). L'échange de plasmides, au sein des biofilms, se fait par des phénomènes de conjugaison. Ainsi, l'organisation en biofilm permet de sélectionner et de répandre des caractères de résistance à des agents antimicrobiens (Donlan et Costerton, 2002). Dans les régions inaccessibles à ces canaux, par exemple au sein des

conglomérats de cellules, des mécanismes de diffusion passive assurent les échanges métaboliques (Stewart, 2003 ; Wanner et Bauchrowitz, 2006). La diffusion des nutriments se fait, de façon inégale, au sein du biofilm, suite à l'existence de gradients. Ceci explique que toutes les cellules n'ont pas la même activité métabolique et donc pas la même vitesse de croissance (Spormann, 2008).

Au sein d'un biofilm, les microorganismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « quorum sensing », jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms (Branda et al, 2005).

1.3.7.1 Facteurs influant sur la formation de biofilms

L'attachement des microorganismes à une surface est un processus complexe, prenant en compte un grand nombre de variables (Tableau 2). De manière générale, l'attachement a lieu préférentiellement sur des surfaces rugueuses (présence d'aspérités), hydrophobes et préalablement recouvertes d'un film protéique. Une augmentation de la vitesse du flux, de la température du liquide ou de la concentration en nutriments peut aussi entraîner une augmentation de la fixation des bactéries à une surface, à condition que ces facteurs n'excèdent pas une valeur critique (Branda et al, 2005 ; Donlan et Costerton, 2002).

De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes. Ainsi, le type de biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms (Clutterbuck et al, 2007 ; Van Gestel et al, 2014).

Tableau 2: Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm D'après Donlan et Costerton (2002).

Propriétés du substrat	Propriétés du milieu aqueux environnant	Propriétés des cellules
*Texture, rugosité, présence d'aspérités	*Température *Cations (Ca^{2+} , Na^{2+} , Fe^{3+} ...) *[Fer], [nutriments] *Sources de carbone disponibles	*Hydrophobicité de la surface des cellules *Présence de flagelles * Rôle des structures polymériques extracellulaires
*Présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface	*Disponibilité du milieu en Oxygène *Présence d'agents antimicrobiens	d'exopolysaccharides

1.3.7.2 Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm

Les mécanismes d'attachement et de détachement d'un biofilm sont étroitement liés, puisque les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement, doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement (Spormann, 2008). Plusieurs facteurs peuvent induire le détachement du biofilm et l'essaimage de bactéries sous forme planctonique, permettant ainsi la colonisation d'autres sites. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- L'action mécanique exercée par un flux de liquide, par exemple au sein d'une vessie,
- L'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple,
- La lyse de cellules du biofilm par l'action d'un phage, d'EDTA, de NaCl, de CaCl₂, ou encore d'agents chélateurs (Spormann, 2008),
- L'action de facteurs de détachements : surfactants ou enzymes dégradant la matrice (Otto, 2008).

La dispersion d'un biofilm peut aussi être initiée par des changements environnementaux : limitation en oxygène ou en nutriments (Spormann, 2008), modification du pH ou présence de certains composés spécifiques (Gjermansen et al, 2005). La dispersion des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* est la plus étudiée (Goller, 2008). Pour ces derniers, une augmentation de la concentration en carbone, citrate, glutamate ou glucose, entraîne un détachement massif de plus de 80% des cellules constituant le biofilm (Sauer et al, 2004).

Les conditions environnementales, notamment la privation en oxygène, jouent un rôle très important dans le déclenchement de la dispersion des biofilms (Thormann et al, 2006). Des biofilms de *Shewanella oneidensis* ont été créés *in vitro* puis soumis 14 heures après leur formation à une privation en oxygène. On a pu observer un détachement massif et immédiat, avec 50 à 80% des cellules qui se sont détachées du biofilm durant les 15 premières minutes d'hypoxie. Ce type de détachement diminue avec l'âge et l'épaisseur du biofilm ; au bout de 48 heures le phénotype du biofilm est modifié, et il devient irréversiblement fixé (Thormann et al, 2006). Au sein d'un biofilm, les bactéries vivent en communauté, sont fixées à un support, et interagissent. On peut ainsi parler d' « écologie du biofilm ».

1.4. Problèmes liés aux biofilms

La formation de biofilms survient dans une très large gamme de situations puisqu'ils se concentrent sur toute interface, solide/liquide, air/solide et air/liquide. Nous ne nous

intéresserons qu'aux biofilms aux interfaces solide/liquide, c'est-à-dire dès que nous sommes en présence d'une surface (inorganique ou organique) et d'un milieu liquide (eau, sang, lait...). Ces biofilms concernent différents domaines :

- la santé
- l'industrie (industrie du papier, industrie du traitement des eaux usées, industries agroalimentaires, industrie du textile...)
- les équipements en eaux naturelles (navires, pipelines, structures portuaires, installations d'aquaculture, capteurs marins, circuits de refroidissement...)

1.4.1 Biofilms dans le secteur médical

Les biofilms peuvent être responsables de nombreuses infections (Hall-Stoodley et al, 2004 ; Fux et al, 2005). Ils sont notamment responsables des maladies nosocomiales, c'est-à-dire des infections contractées au cours d'un séjour hospitalier (Hall-Stoodley et al, 2004). Elles s'effectuent soit par contamination directe avec les matériaux médicaux (cathéters, valves cardiaques, pacemakers, prothèses, dialyses péritonéales), soit par transmission entre patients ou personnel hospitalier ou encore elles peuvent être liées à une contamination de l'environnement hospitalier. Les microorganismes associés à ces infections sont le plus souvent *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme. En effet, 65% des infections recensées dans les pays développés sont dûes à des biofilms. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall- Stoodley et al, 2004). Ces infections sont d'autant plus difficiles à combattre que les bactéries associées en biofilms sont résistantes aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte (Fux et al, 2005).

La liste suivante, non exhaustive, regroupe les principales infections liées à la présence de biofilms (Lewis, 2008) :

- **Infections ou maladies :** Caries dentaires, gingivites, péritonites, mucoviscidose, otite moyenne (notamment chez l'enfant), ostéomyélites et prostatites.
- **Infections nosocomiales :** Sutures, lentilles de contact, port d'un implant médical (sonde urinaire, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, sonde de gastrotomie, valve cardiaque artificielle, prothèse orthopédique et broches (ostéomyélite).

Biofilms et infections nosocomiales liées au port d'implant :

La présence d'implants médicaux favorise la formation de biofilms et est à l'origine d'infections nosocomiales, souvent difficiles à traiter du fait de leurs propriétés d'antibiorésistance. Sur la photographie de gauche (Figure 6), on observe des biofilms de *Staphylococcus aureus*, avec une structure caractéristique en champignon. Sur la photographie de droite (Figure 6), on observe des structures filamenteuses fixées sur des surfaces cylindriques (implant médical) : il s'agit de biofilms de *Pseudomonas* spp (Utili et al, 2007).

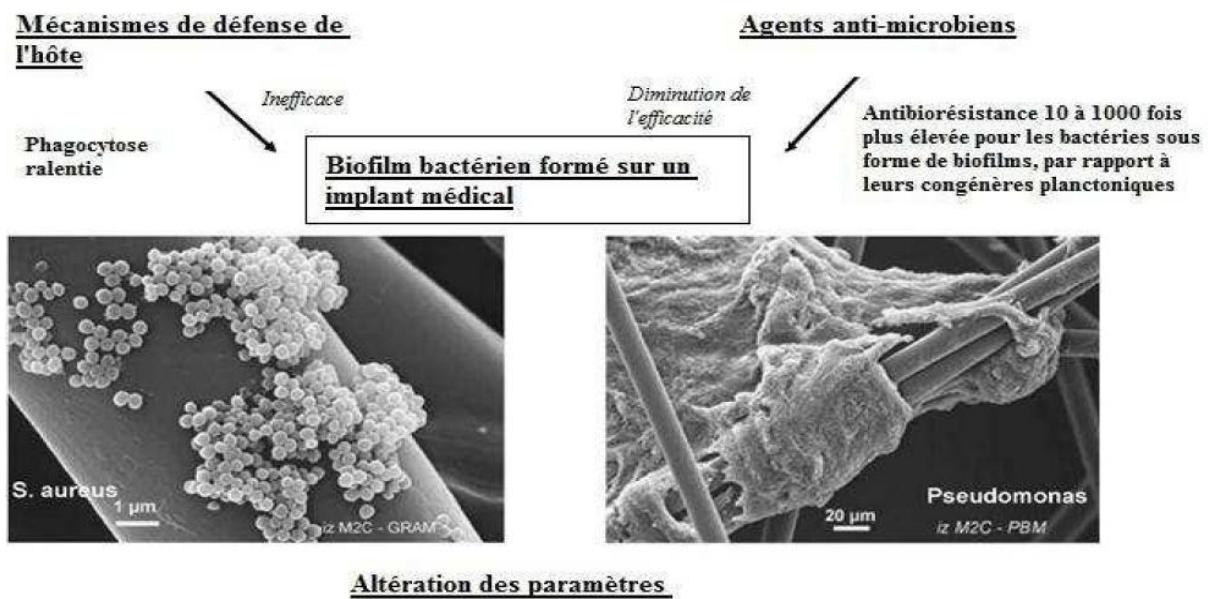


Figure 6 : Biofilms et infections nosocomiales : pourquoi le traitement médical est-il souvent inefficace ? D'après (Utili et al, 2007), avec accord.

La présence de biofilms sur des implants médicaux est à l'origine d'infections nosocomiales, souvent difficiles à traiter. Les biofilms sont plus résistants à la réponse immunitaire de l'hôte que leurs congénères sous forme planctonique : l'efficacité de la phagocytose est donc diminuée en présence de biofilms. De plus, les bactéries sous forme de biofilms sont 10 à 1000 fois plus résistantes à l'action des agents antimicrobiens que celles sous forme planctonique. Ainsi, les propriétés pharmacodynamiques des agents microbiens sont altérées en présence de biofilms : ils sont donc peu efficaces. Ainsi, la présence de biofilms engendre simultanément une diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte et des agents antimicrobiens, ce qui rend l'infection difficile à traiter.

1.4.2 Biofilm dans le secteur alimentaire

Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'industrie agro-alimentaire, en termes d'hygiène alimentaire et d'altération des qualités organoleptiques des produits

alimentaires et ont par conséquent un impact économique important (Wanner et Bauchrowitz, 2006).

Dans le secteur alimentaire, notamment laitier et fromager, la présence de biofilms, sur les parois des équipements ou encore les membranes de filtrations, peuvent entraîner des problèmes de qualité sanitaire des aliments. Ils peuvent en effet servir de niche à des espèces pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (Wong, 1998) et causer alors de sévères problèmes de santé publique (Cerf, 2002).

1.4.3 Biofilm dans le secteur environnemental

Les biofilms de réseau d'eau chaude sanitaire ou de circuits de refroidissement peuvent également abriter des espèces pathogènes telles que *Legionella pneumophila* responsable des légionelloses (Levi, 2001) et *Pseudomonas aeruginosa* responsable de nombreux problèmes de santé publique (Mliji, 2009).

La colonisation biologique des matériaux du patrimoine par la formation de biofilm, encore appelée « encrassement biologique » ou « biofouling » terme utilisé par les anglo-saxon, est une des causes de la détérioration des matériaux (la biodétérioration esthétique, physique et chimique) (Borderie et al, 2014 ; Cutler et al, 2013) couramment étudiée depuis le début des années 80 (Caneva et al., 2008). Ce phénomène est connu sur tous les types de matériaux (pierre, métal, verre, papier, peinture...) et implique de nombreux organismes vivants (bactéries, champignons, microorganismes photosynthétiques, procaryotes et eucaryotes, organismes photosynthétiques pluricellulaires...). Parmi ces organismes, les microorganismes photosynthétiques eucaryotes (tels que les micro-algues vertes) et les microorganismes photosynthétiques procaryotes (les cyanobactéries), sont considérés comme pionniers dans les processus de colonisation, notamment, dans le cas des matériaux en pierre, exposés à des conditions environnementales favorables à leur développement (présence de lumière naturelle ou artificielle et d'humidité) (Barberousse et al, 2006 ; Caneva et al, 2008 ; De Muynck et al, 2010 ; Nugari et al, 2009 ; Scheerer et al, 2009)

1.5 Moyens de lutte contre les biofilms

Les biofilms posent de graves problèmes en matière de santé publique. Ils sont aussi à l'origine de la dégradation de bâtiments. Par tous ces aspects, la présence des biofilms a un impact économique considérable. Il est absolument nécessaire d'éradiquer les biofilms nuisibles. La lutte contre les biofilms peut se définir selon deux axes principaux : empêcher la formation de biofilms, et lorsqu'ils sont déjà présents, les détruire.

1.5.1 Empêcher la formation de biofilms

Il existe plusieurs moyens de lutte contre la formation de biofilms indésirables. On prendra l'exemple du milieu hospitalier, dans lequel les biofilms, à l'origine d'infections nosocomiales, posent de sérieux problèmes de santé publique. Le meilleur moyen d'empêcher la formation de biofilms sur des implants en milieu hospitalier repose sur le respect de quelques principes fondamentaux. La formation de biofilms sur des implants médicaux est liée à la durée de présence de l'implant dans l'organisme. Plus l'implant est là depuis longtemps, et plus il y a un risque de formation de biofilms. La pose de l'implant doit se faire dans des conditions d'hygiène strictes, afin d'éviter au maximum toute contamination bactérienne.

La technique de coating des surfaces représente aussi un moyen de lutte contre les biofilms par des revêtements de surfaces destinés aux biomatériaux implantables (les sondes urinaires, les cathéters veineux centraux...) ou aussi aux d'autres surfaces (les coques des navires, les bâtiments...) (Donlan, 2008). La plupart de ces revêtements contiennent un produit biocide qui se définit comme toute substance active ou préparation destinée à détruire, repousser ou rendre inoffensif les organismes nuisibles par une action chimique ou biologique (directive européenne 98/8/CE).

Pour inhiber l'adhésion des micro-organismes, on peut utiliser la vaccinologie. Des vaccins sont actuellement en cours de développement, comme par exemple les vaccins contre les caries, dirigés contre *Streptococcus mutans* (Bury-Moné, 2007). Le but de la vaccinologie est de former des IgA qui vont inhiber les phénomènes responsables de l'adhésion des microorganismes (Donlan, 2008). Certains vaccins ont été efficaces sur des modèles animaux, mais beaucoup reste encore à prouver (Otto, 2008).

1.5.2 Eliminer des biofilms déjà formés

Lorsqu'on n'a pas pu agir suffisamment tôt pour empêcher la formation de biofilms, le meilleur moyen de lutter contre ces derniers est de les détruire. De nombreuses techniques se font concurrence. En effet, les méthodes employées incluent les méthodes physiques, chimiques et plus récemment, des méthodes de contrôle biologiques (Kumar et Anand, 1998; Steinberg et al, 2005).

Les méthodes physiques généralement utilisées incluent la chaleur et le nettoyage à fond mécanique, le brossage, le grattage et pulvérisation de haute pression. Des champs

magnétique et des ultrasons ont été rapportés pour être utiles dans la suppression de biofilms (Erriu et al, 2014 ; van der Weijden, 2007).

Les méthodes chimiques par l'utilisation de produit chimique (désinfectants, détergents) est aussi commune dans le contrôle de biofilms (Caneva et al, 2008 ; Moreau et al, 2008 ; De Muynck et al, 2009). Ceux-ci sont divisés en deux groupes principaux; d'agents d'oxydation et de non-oxydation. Les oxydants, généralement utilisés, incluent le chlore(Cl), l'ozone(O₃), l'iode (I) et l'eau oxygénée (H₂O₂). Ceux-ci agissent par dépolymérisation de la matrice EPS en perturbant ainsi l'intégrité du biofilm. Les agents non-oxydants incluent des composés d'ammonium d'ensemble de quatre (QACs), le formaldéhyde, des agents actifs superficiels anioniques et non-ioniques sont aussi utilisés. Les tensio-actifs interagissent avec l'EPS, le desserrent et causeront le détachement du biofilm.

Des méthodes biologiques par l'utilisation de bactériophages (Donlan, 2008 ; Chai et al, 2014) et aussi par une élimination ciblée, d'une espèce microbienne au sein du biofilm en déstabilisant l'écosystème du biofilm, en désorganisant totalement sa structure intime, par l'élimination ciblée d'une espèce bactérienne, que l'on aura choisi au préalable (Bury-Moné, 2007). Il y a aussi le bio-contrôle des biofilms par l'utilisation des enzymes dégradant les polysaccharides de la matrice et désorganisant totalement l'architecture du biofilm (Chai et al, 2014), pour enfin aboutir à sa destruction (Donlan, 2008), en plus de l'utilisation des huiles essentielles qui ont prouvé un effet anti-biofilm potentiellement efficace.

Toute fois, d'autres stratégies alternatives sont entretenues et cela vient après la mise en évidence des mécanismes, de l'architecture et la physiologie du biofilm. En effet, des études récentes ont mis en évidence de nouveaux agents anti-biofilm qui sont :

- Des anti-quorum sensing.
- Des inhibiteurs de la formation de l'EPS.
- Des agents réducteurs ou inhibiteurs de l'adhésion microbienne.

1.5.3 Etudes d'éradication de biofilms au Maroc

De nombreux documents ont porté sur les mécanismes d'adhésion et de résistance du biofilm. Alors qu'il est absolument nécessaire d'éradiquer les biofilms qui constituent une préoccupation majeure chez les microbiologistes. Au Maroc, il y a assez d'articles récents qui traitent spécifiquement l'éradication de biofilms. De nombreuses techniques se font concurrence.

La technique de coating des surfaces représente aussi un moyen de lutte contre les biofilms par des revêtements de la surface des olives avec un matériau naturel, tel que *L. plantarum*, peut être une première étape dans le développement de stratégies pour empêcher leur colonisation microbienne (Faten et al, 2016). El-Guendouz et al. (2016) ont montré que l'utilisation de propolis marocaine et de particules nanomagnétique constitue un moyen de lutte contre la formation de biofilms indésirables en permettant la prévention de l'adhérence de presque toutes les souches de SARM (*Staphylococcus aureus* résistante au méthicilline) sur les cathéters. La bacillomycine D et sa combinaison avec l'amphotéricine B présentent des activités anti-biofilm de *Candida albicans* (Tabbene et al, 2016). L'application de ces molécules dans des dispositifs médicaux peut offrir une alternative prometteuse pour le bio-traitement topique des infections associées à *Candida* dans le cadre d'une plaie (Tabbene et al, 2016).

Le système MSL (multi-soil-layering) est une méthode montrée efficace, en particulier pour l'élimination des matières organiques et des nutriments. Les filtres à sable se sont révélés être utiles pour les indicateurs fécaux et l'élimination des parasites. Latrach et al. (2016) ont observé une bonne stabilité opérationnelle et un rendement élevé d'élimination des contaminants des systèmes combinés. Par conséquent, la combinaison du système MSL et du filtre à sable offre une bonne alternative pour la réutilisation des eaux usées agricoles.

Hamadi et al. (2013) ont montré que les propriétés physico-chimiques, y compris l'hydrophobicité et la propriété accepteuse d'électron- donneur d'électrons de la surface en acier inoxydable, ont été fortement affectées par le traitement au lait en réduisant aussi le niveau d'adhérence. Une autre étude de Hamadi et al. (2014) montre que le traitement avec les trois types de lait réduit l'attachement bactérien. Sur le substrat traité, l'étendue de l'adhérence était affectée par le type de lait et par conséquent par la quantité de composant gras. L'adhérence inférieure et supérieure a été obtenue lorsque l'acier a été traité par le lait semi-écrémé UHT et le lait écrémé UHT respectivement. La corrélation entre les propriétés physico-chimiques et l'adhérence de *S. aureus* montre que cette dernière est contrôlée par l'hydrophobicité et les propriétés des donneurs d'électrons.

En effet, les méthodes employées pour lutter contre les biofilms incluent aussi les méthodes chimiques comme la désinfection. Le choix du désinfectant et le temps d'action sont importants lors de l'éradication des biofilms. Amiyare et al. (2015) ont prouvé que la résistance des biofilms d'*Acinetobacter baumannii* aux agents désinfectants doit être prise en compte lors de

l'application de la procédure de nettoyage. Tarrass et al. (2010) ont démontré que l'application de l'ozone dans la désinfection des systèmes de traitement de l'eau pour l'hémodialyse montre une efficacité importante pour tuer les bactéries et dégrader les endotoxines et le biofilm, qui dépend de la concentration et du temps.

L'évaluation de l'effet anti-biofilm des extraits organiques des feuilles de trois espèces végétales de *Mentha* contre les biofilms formés par *S. aureus* et *E. coli* en 48 heures montre un effet spectaculaire antibiofilm avec l'élimination de tous les biofilms formés après 30 min de traitement (Barchan et al, 2016). Lakhdar et al. (2012) ont démontré que l'utilisation des huiles essentielles montre une forte prévalence de la parodontite agressive, liée aux bactéries virulentes parodontales isolées chez les adolescents marocains. L'évaluation de l'effet de quatre composants d'huiles essentielles sur l'adhérence et les biofilms sur deux isolats pathogènes de *Pseudomonas aeruginosa* montre une activité anti-adhérence et antibiofilm des terpènes et souligne l'efficacité exceptionnelle de l'eugénol, du carvone et du carvéol (El abed et al, 2011). Balouiri et al. (2014) ont comparé les contenus phénoliques et l'activité antibactérienne des extraits de méthanol obtenus par sonication et macération classique de *Rosmarinus officinalis* et *Salvia officinalis*. Leur résultats ont montré que la sonication était plus efficace pour l'extraction de composés phénoliques que la macération classique. De plus, tous les extraits ont montré une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives testées (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*). Les bactéries Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) se sont révélées résistantes.

Sadiki et al. (2015) ont prouvé que les échantillons du bois de cèdre traités avec les trois fractions d'extrait de *Thymus vulgaris* (acétate d'éthyle, méthanolique et hexane-acétate d'éthyle) ont indiqué le caractère hydrophile qualitativement et quantitativement, et plus de donneur d'électrons que les non traités. De plus, la prédiction expérimentale et théorique de l'adhésion des spores de *Penicillium* sur des substrats non traités et traités a également été étudiée dans ce travail. Selon les valeurs de l'énergie libre totale (ΔG_{Tot}), l'adhésion de *P. commune* et de *P. commun* sur le bois non traité a été jugée favorable. En revanche, tous les traitements de la surface du bois ont été rendus les conditions d'adhérence défavorables. La microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM) a également montré que l'adhérence des deux spores de *Penicillium* étudiées sur le bois traité était trop faible. Ils ont ainsi trouvé une bonne corrélation entre la prédiction théorique et les expériences d'adhérence. Sur la base de ces résultats, les produits naturels testés pourraient être considérés comme une source alternative de molécules bioactives pour une limitation et inhiber l'adhésion des spores

fongiques sur le bois et donc, pour sa préservation. Une autre étude de Sadiki et al. (2016) a démontré que toutes les fractions testées d'extraits de *Thymus vulgaris* sont capables d'influer sur les propriétés physico-chimiques des trois souches fongiques (*Penicillium commune* (PDLd10), *Penicillium commune* (PDLd ") et *Thielavia hyalocarpa* (PDLb3). En effet, les fractions méthanolique et acétate d'éthyle ont été efficaces pour réduire l'hydrophobicité des surfaces cellulaires CSH et ont rendu les cellules plus hydrophiles et fortement donneuses d'électrons ($P < 0,05$) par rapport aux fractions non traitées. Alors que le traitement par l'hexane et l'acétate d'éthyle les a rendus plus hydrophobes et faiblement donneurs par rapport aux électrons ($P < 0,05$). Ils ont également noté que le degré de modification des propriétés de la surface des cellules microbiennes dépendait de la fraction.

Dans l'étude de Barkai et al. (2016), les activités antifongiques, les concentrations inhibitrices minimales (MIC) et fongicides (MFC) de carvacrol ont été déterminées vis-à-vis de la croissance de spores de *Penicillium expansum*. De plus, les propriétés de surface des spores de la souche étudiée ont également été étudiées en termes d'hydrophobicité-hydrophilie et de donneur et d'accepteur d'électrons par la méthode de l'angle de contact. Ainsi, les résultats obtenus ont permis d'abord de trouver une forte sensibilité de ces spores par rapport à la composante huile essentielle étudiée à travers une très faible CMI et MFC. De plus, les spores non traitées de *P. expansum* présentaient des caractéristiques hydrophiles tant qualitatives que quantitatives et avec des propriétés de donneurs d'électrons très prononcées. L'exposition momentanée des spores à la molécule de carvacrol a conduit au renforcement du caractère hydrophile de la surface des spores avec des propriétés de base quasi monopolaires sur le temps de traitement. Bien que le mode d'action, par lequel les composants de l'huile essentielle inhibent la croissance des microorganismes, soit mal défini dans la littérature scientifique, cette étude contribue à élucider l'impact de ces molécules, et en particulier le carvacrol, sur les propriétés de surface des spores fongiques. Ces propriétés physico-chimiques régissent l'approche et l'adhésion des microorganismes dans la formation des biofilms sur les matériaux (Barkai et al, 2016).

Au Maroc, il n'y a pas d'articles récents qui traitent spécifiquement le bio-contrôle des biofilms par l'utilisation des enzymes. Dans ce contexte, notre étude vise à fragiliser la matrice de biofilm et désorganiser totalement l'architecture du biofilm pour enfin aboutir à sa destruction. Une fois la matrice détruite par l'utilisation des enzymes, les bactéries libérées deviennent alors accessibles aux antimicrobiens.

2. Désinfectants

Plusieurs études mondiales se convergent vers des stratégies permettant d'éradiquer ou prévenir la formation des biofilms. A titre d'exemple, l'utilisation de produits chimiques naturels ou synthétiques, selon des protocoles normalisés. Sous ce cadre, s'inscrivent les nettoyants, les désinfectants, les antiseptiques entre autres, leurs principes actifs, soit des antimicrobiens ou anti-biofilms.

2.1. Historique

1774 : SCHEELE (1749-1786), chimiste suédois, découvrit le chlore.

1789 : BERTHOLLET (1748-1822), chimiste français, a découvert les hypochlorites. Il les a développés dans le petit village de JAVEL, aujourd'hui quai de JAVEL, dans le 15ème arrondissement de PARIS. Ceci explique, la dénomination d'un produit chloré eau de JAVEL.

1811 : BERNARD COURTOIS (1777-1838), chimiste français, a isolé l'iode à partir des cendres de plantes marines.

La teinture d'iode a été utilisée, en 1839, contre la goutte, l'anthrax, le panaris, puis largement employée, pour traiter les blessures de guerre.

1929 : LUGOL, médecin français, a utilisé ce produit dans le traitement des maladies adénopathies cervicales chroniques

Les fondements scientifiques de l'antiseptie et de la désinfection reposent sur les découvertes de PASTEUR. La théorie des microorganismes, responsables d'un certain nombre de maladies infectieuses, marqua la rupture avec les pratiques antérieures. La microbiologie, nouvelle discipline concourut à rendre plus performantes les mesures et pratiques d'hygiène. A partir de 1970, l'élaboration par l'AFNOR (association française de normalisation) de protocoles normalisés d'études, a permis une meilleure connaissance des propriétés antimicrobiennes des antiseptiques et désinfectants. A la même période, la pharmacopée française introduit en Juillet 1985, une note pro-pharmacopée sur les préparations antiseptiques. Un comité européen de normalisation CEN TC 216 « antiseptiques et désinfectants » a été créé dans le but d'harmoniser les normes dans les différents pays européens.

2.2. Définition

Un désinfectant est un produit contenant au moins un principe actif, doué de propriétés antimicrobiennes et dont l'activité est déterminée par un système normatif reconnu. Ce produit doit satisfaire aux normes de base de bactéricidie (NF EN 1040), et peut, en outre, présenter des caractéristiques supplémentaires de fongicidie (NF EN 1275), de virucidie (NF EN 14476) et de sporicidie (NF EN 14347). Les désinfectants doivent surtout satisfaire aux normes d'application, fixant la concentration du produit en fonction du contexte de son utilisation.

2.3. Activité antimicrobienne des désinfectants

Pour vérifier que les désinfectants sont efficaces, il est nécessaire de déterminer si les bactéries sont tuées ou éliminées sous leur action. Ainsi le pouvoir bactéricide d'un agent antimicrobien est généralement évalué à partir d'essais réalisés *in vitro*. La réalisation de ces tests de désinfection est complexe car plusieurs paramètres doivent être définis : choix des germes, préparation des suspensions bactériennes, élimination ou neutralisation de désinfectants. Différentes méthodes ont été ainsi développées, et certaines d'entre elles, sont aujourd'hui standardisées. Parmi les méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne, on distingue essentiellement (Allion, 2004) :

- **Tests sur des cellules en suspension** : ce sont des essais "en suspension", dans lesquels, un inoculum calibré de microorganismes est mis en contact avec différentes dilutions du produit testé.
- **Tests sur des cellules fixées** : ce sont des essais réalisés avec des "porte-germes", dans lesquels, un support est contaminé par la suspension de microorganismes et mis en contact avec les dilutions du produit testé. Le dénombrement des microorganismes, avant et après contact, permet d'apprécier l'activité létale du produit testé.

2.4. Principales familles de désinfectants

De nombreuses familles de produits chimiques ont des propriétés antimicrobiennes. Ces agents peuvent être classés en produits potentiellement létaux, non létaux et des inhibiteurs de croissance (Allion, 2004):

- **Des composés à action létale non spécifique** : ils sont très réactifs chimiquement, tels que l'eau oxygénée, les halogénés, les acides et bases fortes, les aldéhydes et se caractérisent par une action brutale, rapide, temporaire et souvent non spécifique.

- **Des composés chimiquement stables à action plus spécifique:** Ce groupe comprend, entre autre, les ammoniums quaternaires, les dérivés phénoliques, les chloréxidines et ses dérivés.
- **Les inhibiteurs de croissance** (produits non létaux) qui comprennent essentiellement les métaux (mercuriels, dérivés du cuivre, du zinc et de l'argent) et les colorants.

2.4.1 Produits à action létale non spécifique

2.4.1.1 Oxydants

Ces composés ont l'avantage de présenter un large spectre d'activité, une absence de résidus finaux, un faible pouvoir corrosif aux concentrations d'usage et sont facilement éliminables par rinçage. Ils sont, cependant, toxiques aux fortes concentrations et instables pendant leur stockage. Les agents oxydants les plus utilisés sont l'ozone (O₃), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide péracétique (C₂H₄O₃). Leur mode d'action est basé sur la libération d'oxygène entraînant l'oxydation des systèmes enzymatiques. Ainsi, les agents oxydants tels que l'acide péracétique agissant sur les lipides, les liaisons sulfurées et les acides nucléiques. De plus, ils entraînent une désorganisation de la membrane cellulaire (Massicotte, 2009).

2.4.1.2 Halogènes et dérivés

En général, ils ne laissent pas de résidus sur les surfaces, sont efficaces à basse température et possèdent un large spectre d'activités contre les microbes (Allion, 2004). Actuellement, divers produits générateurs de chlore sont disponibles sous forme solide (poudre, comprimés, granulés) : chlorure de chaux, hypochlorite de calcium, hypochlorite de sodium, chloramine et dichloroisocyanurate de sodium (DCCNa). Ils diffèrent par leur teneur en chlore actif, donc par leur efficacité, leur stabilité à la chaleur, la rapidité, la durée de leur action et le pH de leur solution.

2.4.1.3 Acides et bases

L'efficacité de ces composés est liée aux concentrations en ions H⁺ qui agissent sur les liaisons aminoacides des acides nucléiques, modifiant le pH cytoplasmique et précipitant les protéines. Les ions OH⁻ en saponifiant les lipides membranaires, entraînent la destruction de ces structures (Allion, 2004).

2.4.1.4 Alcools

L'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol sont les alcools les plus couramment utilisés. En effet, les alcools sont actifs sur les bactéries Gram+ et Gram - et agissent rapidement (environ

30 secondes) (Massicotte, 2009). L'alcool est surtout utilisé en association avec d'autres substances, comme les dérivés du phénol ; ce qui permet d'en améliorer les capacités bactéricides (Allion, 2004). Par ailleurs, l'alcool est inefficace contre les spores, peu efficace sur les virus et s'évapore rapidement. Il est inactivé par les matières organiques et a tendance à faire coller les débris organiques (salive, sang, bactéries) sur les surfaces. Il ne possède pas d'effet de rémanence.

2.4.1.5 Aldéhydes

Le glutaraldéhyde est l'aldéhyde le plus couramment employé, c'est une molécule hautement réactive (Bouzid et al, 2013 ; Jayakrishnan et Jameela, 1996). Les groupes carbonylés réagissent avec les groupements amines (Migneault et al, 2004 ; Okuda et al, 1991), en inhibant les fonctions vitales des microorganismes (Sano et al, 2005). Le 1,5 dipentanal, est utilisé en tant que biocide dans de nombreuses applications industrielles et notamment dans les hôpitaux, pour la désinfection, à froid, des instruments médicaux (Le Fol et Vaillant, 2009; Sano et al, 2003). En solution aqueuse, le glutaraldéhyde est volatil, légèrement acide, relativement stable (Bonnard, 2010). Il est classé comme toxique par la directive 67/548/CE, Règlement CE n°1272/2008. Par contre, la classification de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économique), le présente comme toxique dans les systèmes aquatiques. Toutefois, le principal inconvénient associé à ces produits est la production de vapeurs irritantes pour les voies respiratoires ainsi que les risques de développer un cancer. Le tableau (Tableau 4) c'est plutôt en page 58 résume l'ensemble des familles de désinfectants et antiseptiques, leurs utilisations et modes d'action.

2.4.2 Produits à action létale spécifique

2.4.2.1 Ammoniums quaternaires

Les Ammoniums quaternaires sont des composés bipolaires comportant un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile, chargé positivement, permettant à la molécule de s'adsorber aux surfaces inertes. Ce caractère amphiphile donne à ce type de molécules des propriétés détersives en plus de son activité bactéricide (Jia et al, 2001a et b). Ils sont généralement plus efficaces sur les bactéries Gram + que sur les bactéries à Gram -, alors que les spores et plusieurs mycobactéries ne sont pas affectées par les ammoniums quaternaires. De part leur propriétés physico-chimique, ces molécules peuvent s'adsorber de manière irréversible aux phospholipides et aux protéines de l'enveloppe bactérienne. Cette adsorption entraîne alors des changements de perméabilité puis des lésions de la membrane cytoplasmique conduisant à

une fuite des constituants cytoplasmiques (notamment les ions potassium). Leur balance hydrophile-lipophile déterminée par la longueur de la chaîne alkylée est un facteur clé de leur efficacité (IUPAC Recommandations 1995). Ainsi, l'activité est maximale pour les molécules en C14 et minimale pour celles qui contiennent 8 à 18 atomes de carbone.

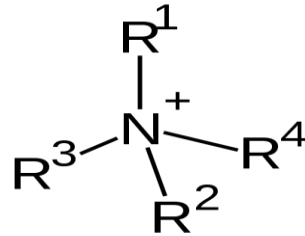


Figure 7 : La structure chimique des Ammoniums quaternaires.

Leur faible toxicité, leur stabilité et leur caractère non corrosif en font des désinfectants de choix. Cependant, leur efficacité bactéricide est atténuée par la présence de matières organiques et par l'eau dure.

2.4.2.2 Biguanides

Le principe actif des biguanides est la chlorhexidine. C'est l'antiseptique le plus populaire de ce groupe. Il a une activité antimicrobienne puissante contre la plupart des bactéries gram positives et certaines bactéries Gram négatives, mais n'ont pas d'activité létale contre les spores (Ebrahimi et al., 2014). Une solution aqueuse à 0,1% est bactéricide contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et en 15 sec. Cependant, il est relativement inefficace contre d'autres organismes gram-négatives, les champignons, les spores, et la plupart des virus. Dans les organismes sensibles, le chlorhexidine perturbe la membrane cytoplasmique. Son activité est potentialisée par l'alcool, les ammoniums quaternaires et le pH alcalin. Et elle est peu inactivée par de fortes concentrations de matières organiques (pus, sang, etc.), l'eau dure, et le contact avec le liège. Elle est incompatible avec des composés anioniques, y compris du savon. Les mélanges de chlorhexidine-alcool sont particulièrement efficaces en combinant la rapidité antiseptique de l'alcool et la persistance de la chlorhexidine.

2.4.2.3 Dérivés phénoliques

Les Dérivés phénoliques sont actifs sur les bactéries à gram positives et à Gram négatives, mais n'ont pas d'activité létale contre les spores. À faible concentration, ils sont bactériostatiques (0,2%) et bactéricides à partir de 1%. Les dérivés phénoliques, dissous dans

l'eau, ont une excellente activité contre les mycobactéries et les virus. Ils agissent sur la membrane cellulaire et inactivent les enzymes cytoplasmiques par formation de complexes instables (Massicotte, 2009). Aux faibles concentrations, les constituants cellulaires sont libérés dans le milieu extérieur, aux fortes concentrations, il y a dénaturation des protéines et lyse de la membrane cellulaire (Maris, 1995). Leur efficacité est dépendante du pH et de la présence de matières organiques.

2.5. Mécanismes d'actions générales des désinfectants

Selon la molécule considérée, l'activité antimicrobienne peut affecter différents constituants cellulaires. De plus, et comme mentionné précédemment, l'efficacité des différentes molécules désinfectantes peut varier en fonction des microorganismes, en fonction de la structure et de la composition cellulaire ainsi qu'en fonction de la physiologie des cellules microbiennes.

Les désinfectants, pour être efficaces, doivent donc être en mesure de s'attaquer à la membrane cytoplasmique ou au contenu de la cellule (Tableau 3). Ces modes d'action sont basés sur les interactions moléculaires entre les désinfectants et les composantes cellulaires en présence (Massicotte, 2009). Il ne faut pas oublier que la membrane cytoplasmique possède une partie polaire, dite hydrophile, et une partie composée de lipides non polaire, dite hydrophobe. Cette dernière nécessite l'utilisation de désinfectants qui attaquent les graisses (lipides). Il existe trois modes d'action possibles des désinfectants : destruction de la membrane cytoplasmique, réduction des échanges avec le milieu extérieur et destruction par oxydation du matériel cellulaire.

Tableau 3 : Mécanisme de l'action antimicrobienne des désinfectants (Massicotte, 2009).

Classes	Exemples	Cible et Mode d'Action	Remarques
Alcools	Ethanol, Isopropanol	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines	présence d'eau nécessaire à l'activité (utilisation d'alcool 70%) / ↓ activité par matières biologiques
Aldéhydes	Formaldéhyde	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines	↓ activité par matières biologiques
Ammoniums quaternaires	Benzalkonium	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule	↓ activité par matières biologiques, savons et oxydants
Biguanides	Chlorhexidine	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol	↓ activité par matières biologiques et savons
Halogènes chlores et iodes	Hypochlorite de sodium (Javel, Dakin) PVP-iodé	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénéation)	↓ activité par matières biologiques et savons / dégradation par rayons UV
Oxydants	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN	↓ activité par matières biologiques
Dérivés phénoliques	Chlorophénole	Altération de la membrane cellulaire et inactivation des enzymes cytoplasmiques par formation de complexes instables	↓ activité par matières biologiques / pH et de la présence de matières organiques

Au fil des années, les bactéries sont devenues de plus en plus résistantes aux désinfectants en développant des mécanismes de défense très efficaces, dont le biofilm qui est pourtant, le mode de vie majoritaire des microorganismes. En effet, il existe 1.000 à 10.000 fois, plus de bactéries grandissant dans un biofilm plutôt que, comme cellules planctoniques. Dans le cas d'un biofilm, les bactéries se protègent grâce à une couche de polysaccharides qui ne laisse pas l'entrée des agents antimicrobiens. A cause de cette matrice d'exopolymères, le biofilm peut être 1.000 fois plus résistant aux biocides que les cellules planctoniques. Plusieurs études ont confirmé l'inefficacité des désinfectants sur l'élimination complète du biofilm, ce qui entraîne un risque de recontamination.

Le nettoyage de ces structures repose donc sur la désorganisation enzymatique de cette matrice complexe, qui est très résistante aux détergents classiquement utilisés. En effet, les enzymes sélectionnés vont agir spécifiquement sur les polymères qui constituent la structure du biofilm, les détruisent et parviennent à arracher le biofilm de sa surface. Une fois le biofilm est décroché de sa surface, le désinfectant peut pleinement agir et assurer une hygiène optimale de la surface. En plus de ces avantages, le traitement enzymatique possède aussi d'autres points forts tels qu'il présente une formule moins agressive pour l'opérateur et non corrosive pour le matériel et présente également un impact positif sur l'environnement.

3. Enzymes

Les enzymes sont des protéines présentes dans tous les organismes vivants et responsables de la catalyse (accélération) de différentes réactions chimiques. Il existe un nombre très important d'enzymes et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. Selon cette classification, à chaque enzyme correspond un numéro EC «Enzyme Commission». Nous nous intéresserons uniquement aux hydrolases (EC 3), enzymes dont la réaction fait intervenir une molécule d'eau et aboutit à la scission d'un composé. Certaines enzymes peuvent, cependant, présenter plusieurs activités.

Une enzyme est spécifique d'un substrat, molécule dont elle catalyse la transformation. A la fin de la réaction, la structure de l'enzyme se retrouve inchangée. Leur mode d'action est basé sur la reconnaissance spécifique du substrat, par un domaine particulier chez l'enzyme (site actif ou site catalytique). L'activité enzymatique est liée à la structure tertiaire de l'enzyme, notamment, à celle du site actif. Des facteurs comme le pH ou la température, pouvant influencer cette structure tridimensionnelle ou encore l'état d'ionisation du site actif, affectent fortement l'activité enzymatique. Chaque enzyme possède donc une température et un pH d'activité optimale.

Les enzymes produites, en quantités industrielles, sont majoritairement d'origine microbienne. Leurs applications concernent principalement les détergents et le secteur agroalimentaire.

Nous décrirons, dans un premier temps, les hydrolases que nous utiliserons pour le criblage du potentiel anti-biofilm. Nous étudierons, ensuite, certaines préparations enzymatiques commerciales, leurs applications industrielles, leur mode de production ainsi que leur composition.

3.1 Hydrolases

Les hydrolases constituent une classe d'enzymes qui catalysent, notamment, les réactions d'hydrolyse des liaisons peptidiques (peptidases ou protéases, EC 3.4), de liaisons osidiques (glycosidases, EC 3.2) et d'esters (estérases, EC 3.1). Nous nous attarderons, plus précisément, dans chaque partie, sur les enzymes ayant été sélectionnées pour le criblage de potentiel antisalissure.

3.1.1 Protéases

Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques et permettent ainsi le clivage de protéines. Il existe deux familles de protéases, les exoprotéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques par l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la protéine et les endoprotéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques internes. Les endoprotéases sont, ensuite, classées selon la nature de leurs acides aminés fonctionnels, arrangés dans une certaine conformation tridimensionnelle pour former le site catalytique (Moss et al, 2011). Parmi elles, il existe les quatre classes suivantes:

- protéases à sérine (EC 3.4.21)
- protéases à cystéine (EC 3.4.22)
- protéases à acide aspartique (EC 3.4.23)
- métalloprotéases (EC 3.4.24)

La spécificité des endoprotéases dépend, également, de la nature des acides aminés impliqués dans la liaison à hydrolyser (acides aminés basiques, aromatiques...). Les protéases sont dites, à large spectre, lorsqu'elles présentent une faible spécificité de clivage.

3.1.1.1 Protéases à sérine - Subtilisine

Cette famille de protéase possède un site catalytique composé de trois acides aminés caractéristiques : histidine, acide aspartique et sérine (Figure 8) (Moss et al, 2011).

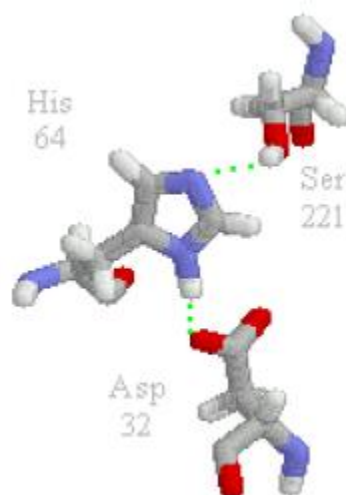


Figure 8 : Triade catalytique de la subtilisine.

On distingue les enzymes de mammifères, enzymes digestives pancréatiques, comme la trypsine (EC 3.4.21.4), la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) ou encore l'élastase (EC 3.4.21.11),

des enzymes bactériennes telle la subtilisine (EC 3.4.21.62). Malgré un mécanisme enzymatique et la géométrie du site actif en commun, ces deux types d'enzymes diffèrent de part leur séquence en acides aminés et leur conformation tridimensionnelle.

Leur mécanisme de coupure est basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine. Grâce à l'histidine et l'acide aspartique qui forment une triade avec la sérine, la liaison OH de la sérine est alors très fortement polarisée. Le mécanisme se déroule en deux temps (Figure 9) :

- Le peptide C terminal est relargué dans le milieu, le peptide N terminal acyle la sérine (enzyme acylée).
- L'eau coupe la liaison acyle, libérant le second peptide et régénérant la forme initiale de l'enzyme.

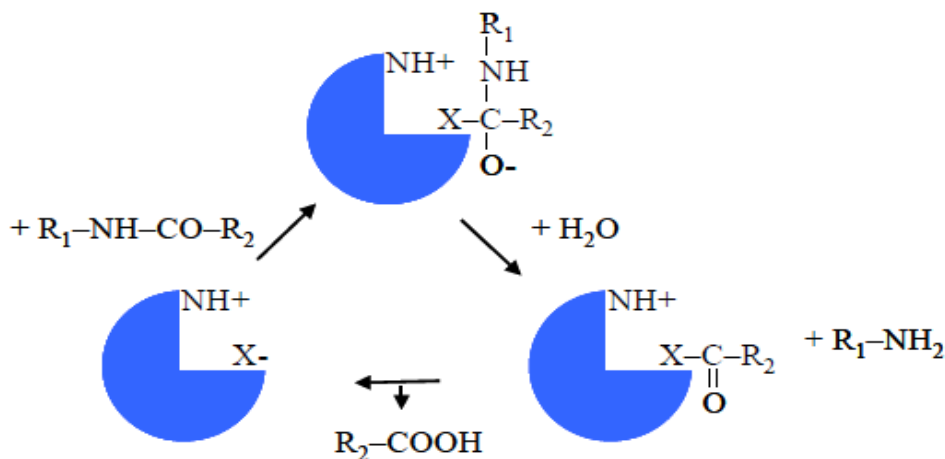


Figure 9 : Mécanisme d'action des protéases à sérine (X=O) et à cystéine (X=S).

La subtilisine est une protéase à large spectre mais qui présente une préférence pour les acides aminés non chargés.

3.1.1.2 Protéases à cystéine - Papaine

Les protéases à cystéine possèdent un site actif composé d'une cystéine, d'un acide aspartique et d'une histidine (Moss et al, 2011). Leur mode de fonctionnement est similaire à celui des protéases à sérine. La réaction se produit via un intermédiaire thiol ester. On distingue, dans cette famille, les enzymes de plantes, comme la papaine (EC 3.4.22.2), de celle des mammifères (cathepsines).

La papaine est une protéase à large spectre, mais qui a tendance à cliver préférentiellement les liaisons impliquant des acides aminés hydrophobes. Elle est présente dans le latex (liquide

laiteux) qui se trouve entre l'écorce et la pulpe de la papaye et, à un moindre degré, dans les feuilles de l'arbre.

3.1.1.3 Métallo-protéases

Les métallo-protéases lient un ion métallique au niveau de leur site actif, le plus souvent Zn^{2+} mais aussi Ca^{2+} . La composition du site actif peut varier selon les métallo-protéases ; il est composé de deux acides glutamiques et d'une histidine pour les carboxypeptidases. On distingue les enzymes de mammifères, enzymes pancréatiques (carboxypeptidase) et les enzymes bactériennes (thermolysine). Comme pour les protéases à sérine, elles diffèrent de part leur structure chimique malgré un mécanisme enzymatique commun.

Une des métalloprotéases est la deutérolysine (EC 3.4.24.39) qui clive principalement les liaisons impliquant des résidus hydrophobes (Moss et al, 2011).

3.1.1.4 Protéases à acide aspartique

Les protéases à acide aspartique présentent un site actif composé de deux acides aspartiques. Elles regroupent des enzymes de mammifères (pepsine, chymosine), d'origine bactérienne (penicillopepsine) et quelques unes d'origine fongique. Leur mécanisme d'action repose sur une réaction acido-basique.

3.1.2 Glycosidases

Les glycosidases hydrolysent les liaisons O- et S- entre des composés glycosidiques et permettent ainsi le clivage des polysaccharides (Figure 10).

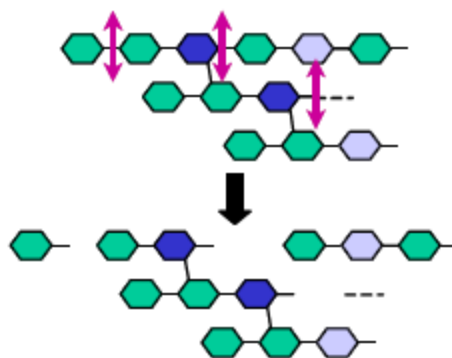


Figure 10 : Représentation schématique d'un clivage enzymatique d'un hétéropolysaccharide, chaque couleur représentant un monosaccharide différent.

En comparaison avec les protéases, les glycosidases présentent une grande spécificité d'action qui dépend de :

- la nature du résidu glycosidique impliqué dans la liaison
- sa configuration D ou L
- sa forme cyclique, pyranose ou furanose
- la nature de leur carbone impliqué dans la liaison
- la configuration anomérique α ou β de la liaison
- la présence de substituants

Nous allons donc sélectionner différentes glycosidases spécifiques de sucres et de liaisons les plus rencontrés dans la nature.

3.1.2.1 Cellulases

La cellulase (EC 3.2.1.4) est en fait un complexe enzymatique comportant 3 types d'enzymes (Moss et al, 2011):

- endo- β -1,4-D-glucanase ou cellulase (EC 3.2.1.4) qui hydrolyse la cellulose en glucane, soit les liaisons 1,4- β -D-glucosidiques,
- cellulose β -1,4-cellobiosidase (EC 3.2.1.91) qui hydrolyse le glucane en cellobioses, soit les liaisons β -1,4-D-glucosidiques également,
- β -glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) qui hydrolyse le cellobiose en glucose.

Ce complexe cellulolytique permet une dégradation complète de la cellulose en glucose. Il est produit, principalement, par des bactéries, notamment celles vivant en symbiose avec des herbivores, leur permettant ainsi de digérer les végétaux.

Il existe, également, une endo- β -1,3(4)-glucanase (EC 3.2.1.6) qui hydrolyse les liaisons 1,3- et 1,4- des β -D-glucanes lorsque le glucose est substitué en C3. Elles permettent, notamment, la dégradation de l'hémicellulose.

3.1.2.2 α -Amylases

Les α -amylases (EC 3.2.1.1) hydrolysent les liaisons α -1,4-D-glucosidiques contenues dans des polysaccharides, contenant au moins trois résidus D-glucose. Elles hydrolysent l'amidon, le glycogène et notamment l'amylose en maltose (Moss et al, 2011). Les amylases sont

présentes dans le jus pancréatique et la salive et sont également synthétisées par les fruits ou les plantes durant leur maturation, ainsi que les céréales durant la germination.

L'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) hydrolyse les liaisons α -1,4-D-glucosidiques des glucoses terminaux. Elle permet l'hydrolyse du maltose, de l'amylopectine et de l'amylose en glucose.

3.1.2.3 Xylanases

Les xylanases (EC 3.2.1.8) clivent les liaisons β -1,4-D-xylosidiques des xylanes en xylose (Moss et al, 2011). Elles permettent, notamment, l'hydrolyse d'hémicellulose. Elles sont produites, principalement, par des bactéries présentes chez les herbivores comme pour les cellulases.

3.1.2.4 Pectinases

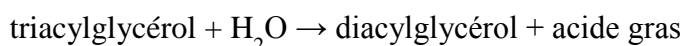
La pectinase (EC 3.2.1.15) ou polygalacturonase hydrolyse le pectate (pectine non méthylée) et autres galacturonanes (Moss et al, 2011). Elle clive la liaison α -1,4 des polymères de D-galacturonanes, en libérant des monomères ou des dimères.

Les pectinases regroupent différentes activités enzymatiques :

- les exopolygalacturonases qui hydrolysent le pectate par une extrémité,
- les pectines méthylestérases qui dé-estérifient les acides galacturoniques méthylés,
- les lyases : endopeptine lyase, endopeptate lyase et exopeptate lyase, elles clivent les liaisons α -1,4 des polymères des D-galacturonanes selon un mécanisme de β -élimination et non plus d'hydrolyse.

3.1.3. Estérases et lipases

Il existe différentes familles d'estérases. Nous nous intéresserons, plus spécialement, à celle des hydrolases d'esters carboxyliques (EC 3.1.1) et notamment à la lipase (EC 3.1.1.3). C'est une triacylglycérol lipase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons esters présentes entre l'acide gras et le glycérol des lipides insolubles dans l'eau :



Les lipases hydrolysent les triacylglycérols en monoacylglycérol, diacylglycérol, glycérol et acide gras libres. La distinction, entre l'activité lipase et l'activité estérase, n'est pas claire à ce jour. On définit les lipases comme des estérases qui peuvent hydrolyser des triacylglycérols à longue chaîne d'acide gras (Moss et al, 2011).

3.2. Mélanges enzymatiques commerciaux

Les enzymes sont de plus en plus utilisées en applications industrielles. Elles permettent notamment de remplacer les produits chimiques. Elles sont produites par les microorganismes au cours de la fermentation (bactéries, levures ou champignons) génétiquement modifiés ou non. Ces préparations enzymatiques ne sont pas pures ; elles possèdent de nombreux additifs et impuretés et renferment, généralement, plusieurs activités enzymatiques.

3.2.1 Production

Les enzymes sont produites par fermentation de microorganismes (bactéries, levures ou champignons). La fermentation liquide est adaptée aux bactéries aérobies, alors que la fermentation, sur milieu solide, est adaptée aux microorganismes fongiques. La souche est sélectionnée en fonction de différents critères. Elle doit être non pathogène, ne pas produire de toxines en milieu de culture, permettre une bonne productivité de l'enzyme et posséder une stabilité génétique. Les microorganismes producteurs d'enzymes peuvent être génétiquement modifiés, afin d'en augmenter la capacité de production. Ceux rencontrés, le plus souvent, sont des champignons du genre *Aspergillus* comme *Aspergillus oryzae*, *A. niger* et *A. aculeatus* qui sont, notamment, utilisés pour produire les estérases, xylanases, amylases, glucanases, pectinase et la deutérolisine. *Trichoderma* est un champignon utilisé pour la production de cellulases (*T. reesei*) et de xylanases (*T. longibradiatum*). La subtilisine est naturellement produite par *Bacillus subtilis* et peut être produite par d'autres espèces du genre *Bacillus* comme *B. licheniformis*. Certaines levures peuvent aussi être utilisées comme *Candida*.

Les enzymes produites peuvent être extracellulaires ou intracellulaires impliquant des procédés de purification très différents. L'extraction se fait par des techniques telles que la filtration stérile, la centrifugation et l'ultrafiltration, réalisées dans les conditions de pH de stabilité optimale pour l'enzyme (Bloom et al, 2005).

Les préparations commerciales enzymatiques peuvent contenir plusieurs enzymes ou plusieurs activités enzymatiques différentes. Elles se présentent sous forme liquide ou en poudre. Contrairement aux enzymes produites en laboratoire, celles contenues dans les préparations commerciales ne sont pas pures. La part d'enzyme dans le mélange peut être parfois négligeable. Les préparations sont en fait caractérisées par une quantité d'activité enzymatique. Il est difficile de connaître la composition exacte de ces préparations. Les

enzymes liquides sont stabilisées par l'ajout de polyols ou de sels (NaCl, MgSO₄...) voire de bactériostatiques alimentaires (benzoates, sorbates, ascorbates...). Les polyols comme le sorbitol ou le glycérol représentent entre 20 et 50% de la formulation. Les enzymes en poudre sont supplémentées en support d'atomisation (supports alimentaires comme l'amidon, maltodextrine, sucre ou sel) afin notamment d'éviter la formation de grumeaux ou d'agrégats. Il existe également des enzymes sous forme de microgranulés.

La papaïne est produite par le papayer. Elle est extraite par incision de la papaye et récoltée du latex. Elle est purifiée par filtration, centrifugation et atomisation. On ajoute ensuite des réducteurs (glutathion, sulfite, cystéine) afin d'éviter toute oxydation.

Certaines enzymes sont d'origine animale, elles sont utilisées en industrie laitière surtout et produites par présure animale ou par extraction d'estomacs macérés, de jeunes bovidés.

Les hydrolases commerciales du fait de leur disponibilité, leur biodégradabilité, leur moindre toxicité, seront étudiées dans le domaine des étapes initiales d'adhésion des biofilms, en prévention comme en nettoyage d'un biofilm, dans divers secteurs, afin d'hydrolyser les molécules organiques (protéines et polysaccharides) impliquées dans les mécanismes de formation des biofilms.

3.2.2 Applications

Les enzymes extraites des végétaux et des tissus des animaux, ainsi que celles produites par des microorganismes (bactéries, levures et champignons), sont utilisées depuis des siècles dans divers secteurs médicaux et industriels (industrie agroalimentaire : alimentation animale, production de boisson (jus de fruits, vins, brassage de bière), industrie laitière et fromagère, alimentation céréalrière, panification, produits carnés, fabrication d'aliments à base de produits de mer ; industrie de fabrication du papier ; industrie du textile, délavage des jeans ; détergents ménagers et industriels...) (Tableau 4). Leur activité, leur spécificité d'action ainsi que les conditions réactionnelles en font d'excellents outils de catalyse.

La subtilisine, présente dans différents mélanges enzymatiques commerciaux, est notamment utilisée en industrie du textile, en tant que détergent, pour augmenter l'efficacité de lavage (Shuang Li et al, 2012). Les lipases sont également employées dans l'industrie du textile et présentes dans les détergents ménagers et industriels afin d'éliminer les taches de gras.

Les applications de la papaïne sont diverses. Elle peut être utilisée en pharmaceutique car elle présente des propriétés anti-inflammatoires, en industrie alimentaire, notamment, pour

l'attendrissement de la viande, et en industrie du textile, comme agent nettoyant ou détergent. La deutérollysine est employée dans l'industrie laitière, notamment, dans la fabrication de fromages comme enzyme coagulante (Desmazeaud et Spinnler, 1997).

Les hémicellulases, pectinases et cellulases sont utilisées pour la dégradation des parois des cellules végétales (Bonnin et al, 1997). Les pectinases permettent d'augmenter la capacité d'extraction dans la fabrication des jus de fruits et de légumes et, en œnologie, d'augmenter l'arôme des vins. Les hémicellulases et les xylanases sont utilisées dans la valorisation des sous produits végétaux destinés à l'alimentation animale. Les cellulases sont, également, employées dans l'industrie du textile et dans la fabrication du papier. Les xylanases servent aussi pour le blanchiment (sans chlore) des pulpes de bois, dans l'industrie de fabrication du papier.

Les amylases et les β -glucanases sont très utilisées, dans les procédés de production de bière (Boivin, 1997). Les amylases permettent, notamment, la dégradation de l'amidon et une meilleure assimilation, par les levures. Les β -glucanases sont utilisées pour prévenir des difficultés de filtration dues aux β -glucanes. Les amylases servent, aussi, pour les procédés de panification. Les β -glucanases sont également utilisées, en œnologie, permettant la lyse des parois des levures (Bhanwar et Ganguli, 2014).

Les méthodes classiques de nettoyage mises en œuvre dans divers secteurs sont souvent très agressives pour le matériel et peu respectueuses de l'environnement. Dans certains cas, elles montrent de plus une efficacité limitée, notamment contre les biofilms. L'exploitation de nettoyage enzymatique apparaît comme une solution alternative, plus douce, et non corrosive pour le matériel. Dans les trente dernières années plusieurs études ont été brevetées dans le bio-contrôle des biofilms (Tableau 4).

Tableau 4 : Enzymes dont l'utilisation est brevetée dans des compositions de lavages et/ou contre la formation de biofilms.

Inventeurs	Enzymes testées	Domaines d'applications
McCarty (1971)	Alcalase, Maxatase	Composition détergente, Lavage des textiles
Aunstrup et al. (1972)	Protéase de <i>Bacillus alcalophilus</i> NCBI 8772	Composition détergente, Lavage des textiles
Mausner et wiesenfeld. (1972)	Enzyme AP (mélange de protéase et amylase), Lipase A	Composition détergente, Lavage des textiles

Barrat (1973)	Alcalase, protéase de <i>Bacillus alcalophilus</i> NCBI 8772 , protéase de souche bactérienne NCBI 10 147	Composition détergente, Lavage des textiles
Hatcher et al. (1973)	Levane hydrolase	Boue des eaux industrielles issues de l'industrie du papier
Jones et Collier (1974)	Subtilisine, α -amylase	Composition détergente, Lavage des textiles
Inamorato et Hunter (1976)	α -amylase, protéase alcaline	Composition détergente, Lavage des textiles
Christensen et Zivtins (1977)	Rhozyme HP-150	Boue des eaux industrielles, Circuits de refroidissement
Weber (1979)	Subtilisine	Composition détergente, Lavage des textiles
Stanislowski et Wiersema (1985)	Protéases alcalines ou neutres : Esperase, Alcalase, Savinase, Maxacal, Maxatase, Mylezyme	Composition de lavage
Durham et al. (1986)	Cellulase	Systèmes d'égouts
Miyajima et al. (1987)	Cellulosin (cellulase ou hémicellulase), Gluczyme (amylase), pectinase, héparinase, dextranase	Composition détergente pour lentilles de contact
Liu (1990)	Alginate lyase	Circuits de refroidissement
Wiatr (1990)	Protéase alcaline α -amylase, β -glucanase (cellulase)	Circuits de refroidissement
Carpenter et al. (1990)	Endoglycosidase type II	Elimination de biofilm sur des surfaces
Hernandez-Mena et Friend (1993)	Pectinex, Novozyme 234, galactosidase, galacturonidase, rhamnosidase, xylosidase, fucosidase, arabinosidase, α -glucosidase	Boues des eaux industrielles
Hollis et al. (1995)	Diazyme L-200 (glucohydrolase), HT Proteolytic 175	Circuits de refroidissement Industrie du papier
van Pee et al. (1996)	Mannanase	Elimination de biofilm sur des surfaces
Aldridge et al. (1998)	Espérance, Alcalase, Vibriolysine, carbohydase, Lipolase	Circuits de refroidissement

Letartre (2002)	Alginate lyase, dextranase, cellulase, glucosidase, amylase, carbohydase, protéase, lipase	Désinfection de matériels médicaux
Budny et Budny (2000)	Polysaccharides hydrolases	Contrôle de la plaque dentaire
Johansen (2001)	Pectinex Ultra SP	Composition de lavage et ou de désinfection (matériels médicaux)
Serran et al. (2001)	Citrozym, trypsine	Elimination de biofilm aux interfaces solide/liquide/air ou solide/liquide
Heinen et al. (2002)	α -amylase (Aquazyme 120L, AMG300L), cellulases (Viscozyme, Celluclast, Denimax, Novozyme 188L), lipase (Lipolase, Novozyme 868), protéases (Savinase, Neutrase, Flavourzyme, Alcalase)	Extraction de microorganismes à partir de boues
Yacobi-Zeevi (2002)	Héparanase	Désinfection de surfaces contre <i>Pseudomonas</i>
Baldrige et Michalow (2003)	Estérase, lipase, chymotrypsine, cystine arylamidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, β -glucosidase, α -mannosidase	Systèmes de filtration (osmose inverse, traitement des eaux usées)
Manyak et al. (2004)	Mélange d'enzymes produites par <i>Alteromonas</i> 2-40 sur agar complémenté en polysaccharides représentant ceux des biofilms	Applications industrielles et thérapeutiques
Marion et Sanchez (2004)	Trypsine, pancréatine, protéase fongique, thermolysine	Désinfection et décontamination de matériels (médicaux)
Barton et al. (2005)	Déacétylase, cellulase, estérase, glycosidase, xylanase, amylase, transaminase, laminarinase, β -galactosidase, β -mannosidase, pullulanase, amidase	Contrôle du biofilm
Sava (2004)	Protéase, amylase	Systèmes de recirculation d'eau
Xu (2004)	Acylase (Substrat : Lactone)	Elimination, prévention de biofilm

Céline Leroy (2006)	Lipases, protéases, glycosidases	Contrôle des salissures marines
Kumar et al. (2008)	polyol oxydases	applications détergentes pour le nettoyage, le blanchiment et la désinfection.
Christopher Barnett et al. (2009)	protéases, glucanases, estérases, mannanases, phospholipases, cellulases, amylases	Elimination, prévention de biofilm
Gordon Blackmen et al. (2010)	protéase, laccase, polysaccharidase	Elimination, prévention de biofilm
Molobela et al. (2010)	protéase, amylase	Elimination, prévention de biofilm
Marcato-Romaina et al. (2012)	Lipases, protéases, glycosidases	Elimination des biofilms dans l'industrie du papier
Kim Dr et al. (2013)	lyticase, endoglucanase protéase	Traitement des membranes de filtration
Singh et al. (2015)	protéases, amylases, pectinases	Elimination, prévention de biofilm

Chapitre – II : Matériels et méthodes

1. Produits à potentiel anti-biofilm

1.1. Désinfectants

Dans le but de tester l'activité anti-adhésion et anti-biofilm, quatre produits commercialisés sont testés. Les caractéristiques des différentes préparations désinfectantes commerciales que nous avons choisies d'utiliser sont répertoriées dans le Tableau 5. Les désinfectants ont été sélectionnés en fonction de leurs principes actifs, l'étude bibliographique sur la nature des produits les plus utilisés et leur disponibilité.

Les données regroupées dans le Tableau 5 proviennent des fiches produits des fabricants, certaines informations n'étant pas complètes.

Tableau 5 : Compositions des désinfectants testés.

Produits	Principes actifs	Concentration	pH
P1	Ethanol (94%), 1-propanol	25% 35%	6
P2	H2O2, surfactant anionique	2% 5%	2-3
P3	Hypochlorite de sodium (Eau de javel)	12°	11,5-12,5
P4	Alcool gras polyalcoxylé, oxyde de lauryldiméthylamine, chlorure de didécylidiméthylammonium, polyhexaméthylène biguanide, agent séquestrant et dispersant	Non mentionnée	4,6

1.2. Enzymes

Les caractéristiques des différentes préparations enzymatiques commerciales, que nous avons choisies d'utiliser, sont répertoriées dans le Tableau 6. Les enzymes ont été sélectionnées en fonction de leur large spectre d'activité, l'étude bibliographique sur la nature des EPS et leur disponibilité. Concernant les protéases, nous avons sélectionné différentes sous classes

d'enzymes au spectre d'activité large. Concernant les glycosidases, nous avons choisi une gamme de diverses activités représentatives de la nature des résidus glycosidiques et des liaisons les plus rencontrées. Nous pouvons ainsi tester quatre protéases et quatre glycosidases.

Les données regroupées, dans le Tableau 6, proviennent de fiches produits des fabricants. Certaines informations n'étant pas complètes, l'étude bibliographique a permis d'apporter des précisions.

Tableau 6 : Caractéristiques des préparations enzymatiques commerciales testées sur le biofilm.

Classe d'enzyme	Nom de marque	Fabricant	Origine	Numéro EC	Nom de l'enzyme (Sous classe)	Formulation	activité enzymatique	Optima pH	Optima Tp (°C)	Application
Protéases	Protéase P3910	Sigma Aldrich	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.4.21.62	Subtilisine A	poudre	2,5-7,0 U.mg ⁻¹	>8,5	50	dosages des fibres alimentaires
	Trypsine T9201	Sigma Aldrich	Pancréas de bovin	3.4.21.4	Trypsine	poudre	≥7,500 BAEE U.mg ⁻¹	7,6	25	Divers (pharmaceutique, expérimentation..)
	Pepsine P7000	Sigma Aldrich	Muqueuse gastrique chez le porc	3.4.23.1	Pepsine	poudre	≥ 250 U.mg ⁻¹	2-4	60	Divers (pharmaceutique, expérimentation..)
	Papaine P3250	Sigma Aldrich	Latex de papaye séché	3.4.22.2	Papaïne (cystéine endopeptidase)	poudre	0,5-2,0 U.mg ⁻¹	6-7	25	Divers (alimentaire, pharmaceutique, textile)
Glycosidases	Xylanase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> X2753	Sigma Aldrich	<i>Aspergillus oryzae</i>	3.2.1.8	Xylanase	poudre	≥ 2500 U. g ⁻¹	5	70	Spécifiques des pentosanes solubles du blé
	β-glucanase 49101	Sigma Aldrich	<i>Aspergillus Niger</i>	3.2.1.6	β-glucanase	poudre	1 U.mg ⁻¹	5	55	Brasserie
	Pectinase P2736	Sigma Aldrich	<i>Aspergillus Niger</i>	3.2.1.15	Polygalacturonase	Liquide	Substance non encore testé			biotechnologie végétale et la transformation des aliments
	Cellulase 22178	Flukabiochimica	<i>Aspergillus Niger</i>	3.2.1.4		poudre	0,8-1,0 U.mg ⁻¹			

2. Microbiologie

2.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées, dans cette étude, ont été isolées à partir de trois secteurs très touchés par les problèmes engendrés par les biofilms, à savoir : le secteur médical, agroalimentaire et environnemental. Les sept bactéries étudiées se sont prouvées biofilm positif par plusieurs méthodes (génétique, microscopique et physicochimique) (Oufrid et al, 2015; Ghazlane et al, 2014; Oufrid et al, 2014; Mliji et al, 2007).

En s'intéressant au secteur environnemental, nous avons choisi d'utiliser la bactérie modèle *Pseudomonas aeruginosa* P59 pour ses fortes capacités d'adhésion sur des coupons de polyéthylène utilisé dans les circuits d'eau domestique, surtout qu'elle a été isolée à partir d'eau potable.

Tandis que, pour le secteur agroalimentaire, nous avons utilisé deux souches différentes isolées à partir des produits alimentaires. *Salmonella* spp a été choisie pour son aptitude à former le biofilm sur l'inox, un matériel tellement utilisé dans les industries agroalimentaires. Nous avons également utilisé, au cours de cette étude, une autre bactérie de genre *Escherichia coli* qui présente des propriétés physico-chimiques de surface, différentes de celle de *Salmonella* spp en possédant un caractère plus hydrophile et en s'adhérant plus sur le verre qui présente aussi, une surface très employée, dans le secteur agroalimentaire.

Concernant le secteur médical, pareillement, nous avons choisi d'étudier quatre souches distinctes caractérisées par leur aptitude à former le biofilm sur diverses surfaces utilisées dans le secteur médical. *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogènes* ont été isolées à partir d'un biofilm, formé sur des cathéters, alors que, les deux autres souches *Staphylococcus warneri* et *Staphylococcus sciuri* ont été choisies pour leurs fortes capacités d'adhésion sur des plaques de polystyrène, surtout qu'elles ont été isolées à partir des surfaces du service d'hémodialyse.

2.2. Conditions de culture

Pour le stockage à long terme, les bactéries sont stockées à -80°C dans du glycérol 30% (v/v) après culture liquide dans Luria-Bertani (LB).

En culture solide et liquide, elles sont cultivées respectivement sur LB solide et dans le bouillon LB à la température optimale, de chaque souche bactérienne, jusqu'à ce qu'elles atteignent leur phase stationnaire de croissance.

N.B. Toutes les expériences ont été réalisées, en conditions aseptiques, en utilisant des solutions et des milieux de culture stérilisés à l'autoclave (120°C pendant 30 minutes). Toutefois, certaines solutions ne pouvant pas être autoclavées (comme les solutions enzymatiques, les désinfectants) ont été stérilisées par filtration, sur filtres seringues Millex stériles 0,22 µm à usage unique, en conditions aseptiques.

3. Détermination de l'activité inhibitrice de croissance des différentes molécules sur des bactéries planctoniques

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'activité d'un produit à effet antimicrobien est la concentration minimale inhibitrice (CMI). D'ailleurs, plusieurs méthodes permettent la détermination de la CMI, les plus utilisées étant les méthodes de dilution (effectuées en milieu liquide ou en milieu solide) ou la méthode de diffusion (basée sur l'application de disques de papier buvard, imprégnés de substances à tester).

Pour ce travail, nous avons utilisé la méthode de microdilution, effectuée en milieu liquide sur microplaques, selon le protocole du Comité National des Normes Cliniques de Laboratoire NCCLS en 2006. Cette technique nous a permis d'économiser, non seulement le milieu de culture, mais surtout les produits à tester. Le milieu liquide utilisé est celui de LB. Les produits, à tester, sont incorporés en solution, à des concentrations croissantes, dans les cupules d'une plaque de microtitration stérile. Chaque dilution a été placée, en contact d'un inoculum bactérien, en phase de croissance exponentielle, avec une concentration d'environ 10^6 et 10^7 UFC.ml⁻¹, obtenu à partir d'une culture bactérienne en bouillon de 24 heures à 37 °C. Dans les mêmes conditions, une culture témoin (sans substances à tester) a été réalisée, simultanément, pour vérifier que les souches sont en phase exponentielle, même après 18 heures d'incubation. Après incubation à 37°C, pendant 18 à 20 heures en atmosphère ordinaire, la CMI est indiquée par la concentration du puits qui contient la plus faible concentration du composé à tester et où aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Des corrections de dilutions successives sont nécessaires afin de remonter à la CMI finale.

Chaque essai est répété trois fois sur des plaques différentes pour pouvoir comparer les résultats afin de confirmer la CMI.

4. Détermination de l'activité bactéricide de croissance des différentes molécules sur des bactéries planctoniques

Après avoir déterminé la CMI des différentes molécules étudiées, leur concentration minimale bactéricide (CMB) est déterminée par la plus faible concentration de substance nécessaire pour éliminer 99,9% des bactéries initialement présentes.

A partir du témoin (inoculum bactérien sans produits à étudier) et des puits dans lesquels aucun trouble n'a été observé, et en commençant par le puits de la CMI, une numération a été réalisée par une dilution au $10^{\text{ème}}$. On a obtenu 4 dilutions à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Dix microlitres de chaque dilution, ainsi que l'inoculum initial, ont ensuite été étalés sur une gélose LB (3 répétition par dilution). Après 24 h d'incubation à l'étuve à 37°C , le nombre de colonies sur les boîtes a été comparé à celles de la boîte de numération du témoin. La concentration minimale bactéricide est donc déterminée, par la plus petite concentration (supérieure ou égale à la CMI), ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum pur. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide du produit analysé.

5. Formation du biofilm en microplaque

La Figure 11 représente le protocole, mis au point, afin de former des biofilms en microplaque, révélés et quantifiés, grâce au cristal violet. Ce protocole est détaillé dans les paragraphes qui suivent.

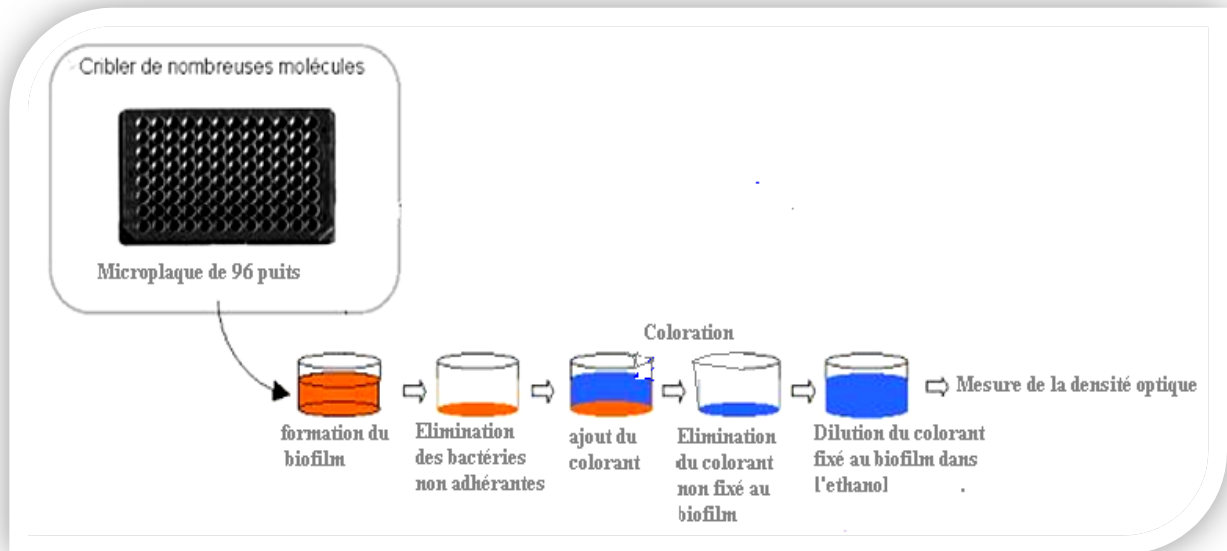


Figure 11 : Représentation schématique du protocole de formation du biofilm en microplaque, révélé au cristal violet, solubilisé dans l'éthanol.

5.1. Suspension bactérienne

Les bactéries sont récoltées sur LB solide, après avoir été incubées une nuit, à 37°C. Elles sont raclées, à l'aide d'une pipette pasteur, au bout arrondi, dans la flamme et mises en suspension, dans du bouillon LB. La suspension obtenue est sédimentée par centrifugation à 8400 ×g, pendant 15 min. Le surnageant est enlevé et le culot est repris dans du tampon PBS, puis centrifugé pendant 15 min à 8400 ×g. Le surnageant obtenu est ensuite enlevé et le culot est repris dans un volume de LB liquide et la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde optimale, correspondante, de chaque souche étudiée. La suspension bactérienne lavée est ensuite ajustée à environ 10^8 UFC.ml⁻¹. Le lavage de la suspension bactérienne permet d'éliminer toutes molécules et métabolites secondaires exerçant un effet toxique ou inhibiteur pour ne pas fausser les résultats des produits inhibiteurs testés au cours de notre étude.

5.2. Biofilm en microplaque

200 µl de bouillon LB, stérile, est distribuée sur les 12 puits de la première rangée de microplaque et 200 µl de suspension bactérienne est distribuée dans les 84 autres puits, d'une microplaque de 96 puits, stérile, à fond rond, en polystyrène. La microplaque est recouverte et incubée, de 2 heures à 24 heures, à 20°C, sous agitation orbitale (vitesse 300 rpm). Les différents dépôts sont effectués, par colonnes, à l'aide d'une pipette à 8 canaux. Après incubation, le biofilm formé est révélé par le cristal violet, comme il est décrit dans le paragraphe qui suit.

La formation du biofilm est analysée sur des supports différents, selon la souche bactérienne étudiée, que se soit sur l'inox et le verre, qui ont été utilisés, sous forme de billes, introduites dans les puits de la plaque de microtitration de 96 puits, ou bien sur le cathéter, qui a été coupé en petits coupons et introduit aussi dans les puits de la plaque de 96 puits, ou sur le tuyau de polyéthylène coupé en coupons et introduit dans les puits de plaque de 24 puits.

Chaque essai est répété, trois fois, sur des plaques différentes, pour pouvoir comparer les résultats.

5.3. Cristal Violet : Essai de coloration

La formation du biofilm est évaluée, indirectement, en utilisant l'essai du cristal violet, inspirée de l'étude décrite par Djordjevic et al en 2002, avec quelques modifications.

Les bactéries, non adhérees, sont éliminées par trois lavages successifs, à l'eau distillée, préalablement stérilisée à l'autoclave. Les lavages sont effectués manuellement: la microplaque est renversée, 220 µl d'eau distillée stérile est ajoutée par puits, la microplaque est agitée et à nouveau renversée. 220 µl de 1% du cristal violet est ajouté par puits. La microplaque est incubée au minimum 15 min puis, l'excès du cristal violet est éliminé par trois lavages manuels, successifs, en eau distillée. Pour ne pas fausser les résultats, et qualifier seulement le biofilm, développé sur le support étudié, chaque support doit être transféré vers une autre microplaque stérile. Le cristal violet, complexé aux bactéries adhérees, est alors solubilisé par ajout de 220 µl par puits, d'une solution d'éthanol à 95%. 200 µl provenant de chaque puits est ensuite transféré à une nouvelle plaque et l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde optimale qui correspond à chaque souche étudiée.

6. Traitements du biofilm

Les produits désinfectants sont testés, trois fois, sur trois microplaques différentes, pour une gamme de sept concentrations étendues de 1/2 à 1/128, concernant les protocoles de prévention, et pour une gamme de huit concentrations étendues du produit pur à 1/128 concernant les protocoles de lavage.

Les enzymes sont testées, au moins trois fois, sur trois microplaques différentes, dans une gamme de cinq concentrations diluées en série, concernant les protocoles de prévention et de lavage. Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration des enzymes en activité enzymatique par millilitre de milieu réactionnel.

6.1. Plan de microplaque

On dépose, par puits, une solution contenant, en même temps, la suspension bactérienne ajustée à 10^8 UFC.ml⁻¹ en plus du désinfectant ou de l'enzyme, dont l'effet sur le biofilm est à étudier avant ou après la formation du biofilm.

Les produits désinfectants, sous forme liquide, sont dilués au demi dans de l'eau ultra pure.

Ne sachant pas, si nous observerons un effet, ni à partir de quelle concentration il serait observable, nous avons décidé de tester les préparations enzymatiques, à la plus forte concentration possible, étant donné les conditions de notre test. L'enzyme pectinase, sous forme liquide, est testée dans une gamme de 5 concentrations étendues de 1/4 à 1/64, diluées en série. Les enzymes sous forme solide (poudre) sont reprises dans leur solvants, correspondant à des concentrations au maximum de leur solubilisation pour les glycosidases et les protéases (tableau 7). Elles sont ensuite testées, à 5 concentrations différentes, successivement diluées et filtrées sur 0,22 μ m, en conditions stériles. Ces solutions sont alors stockées, à 4°C et utilisées durant la semaine.

Tableau 7 : Concentration des solutions enzymatiques, initiales, solubilisées en solvant stérile, avant d'être déposées en microplaque.

	Protéases				Glycosidases			
	Protéase P3910	Trypsine T9201	Pepsine P7000	Papaïne P3250	Xylanase X2753	β -glucanase 49101	Pectinase P2736	Cellulase 22178
Solvant	eau ultra pure	HCl 1 mM	eau ultra pure	eau ultra pure	PBS	eau ultra pure	eau ultra pure	eau ultra pure
Concentration	5 mg.ml ⁻¹	5 mg.ml ⁻¹	4 mg.ml ⁻¹	10 mg.ml ⁻¹	5 mg.ml ⁻¹	2 mg.ml ⁻¹	50% (v/v)	2 mg.ml ⁻¹

Chaque microplaque comporte en première ligne (A), les témoins négatifs ou blancs composés uniquement de bouillon LB, stérile, sans bactérie et en dernière ligne (H), les témoins positifs ou contrôles, composés uniquement de suspensions bactériennes incubées, sans traitement. Le plan de la microplaque est résumé sur la Figure 12.

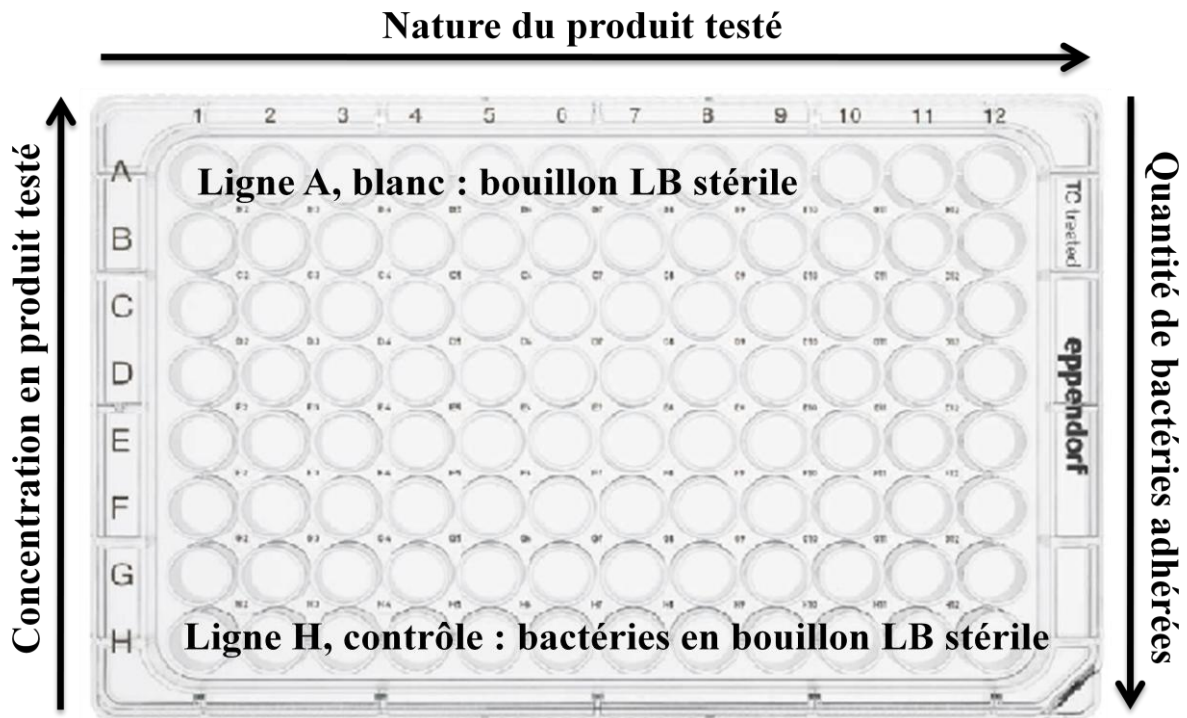


Figure 12 : Plan de microplaque en vue de tester l'effet des enzymes et des produits désinfectants.

Ai : Blancs, 200 µl bouillon LB stérile

Bi : 200 µl : C₁ + suspension bactérienne à 10⁸ UFC.ml⁻¹

Ci : 200 µl : C₂ + suspension bactérienne à 10⁸ UFC.ml⁻¹

Di : 200 µl : C₃ + suspension bactérienne à 10⁸ UFC.ml⁻¹

Ei : 200 µl : C₄ + suspension bactérienne à 10⁸ UFC.ml⁻¹

Fi : 200 µl : C₅ + suspension bactérienne à 10⁸ UFC.ml⁻¹

Gi : 200 µl : C₆ + suspension bactérienne à 10⁸ UFC.ml⁻¹

Hi : 200 µl suspension bactérienne à 10⁸ UFC.ml⁻¹

6.2. Protocole de prévention

Le protocole de prévention consiste à déposer 200 µl, de chaque produit (désinfectant ou d'enzyme dont l'effet anti-adhésion sur le biofilm est à étudier), à chaque concentration testée par puits, avec la suspension bactérienne ajustée à 10^8 UFC.ml⁻¹.

Un produit est testé, sur une colonne, dans une gamme de concentration, en utilisant des dilutions en série. Un volume de 200 µl recouvre la surface du fond du puits. Après le temps d'incubation optimum qui correspond à chaque bactérie étudiée, à 37°C, sous agitation orbitale (300 rpm), le biofilm est révélé au cristal violet, comme décrit dans le paragraphe 5.3.

Une mesure de l'efficacité, appelée pourcentage d'inhibition PI, a été utilisée pour évaluer le potentiel préventif ou anti-adhésion de ces produits.

$$\text{Équation 1 : PI} = \frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \times 100\%$$

C, Absorbance du contrôle (Ligne H) ; B, Absorbance du blanc (Ligne A) ; T, Absorbance de l'échantillon traité.

Ensuite, les valeurs des taux d'inhibition sont reportées, en fonction de la concentration, dans le milieu réactionnel, en produit désinfectant déposé et en activité enzymatique par millilitre de milieu réactionnel pour les enzymes.

6.3. Protocole de lavage

Le protocole de lavage consiste à déposer 220 µl de chaque produit, à chaque concentration testée par puits, sur un biofilm préformé.

Le biofilm est formé préalablement comme décrit dans le paragraphe 5.2. Après le temps d'incubation optimum, correspondant à chaque bactérie étudiée, la microplaque est alors lavée, trois fois, à l'eau distillée stérile. Pour étudier seulement, le biofilm développé, sur le support étudié, chaque support doit être transféré vers une autre microplaque stérile. 220 µl de chaque produit, à chaque concentration, est ajouté par puits, et 220 µl d'eau distillée stérile est ajouté pour le blanc et le contrôle en colonnes A et H. Les dilutions en série des produits sont réalisées préalablement juste avant le dépôt. Après incubation à température ambiante pendant 10, 20 et 30 min, le biofilm est révélé avec du cristal violet tel que décrit dans le paragraphe 5.3.

Une mesure de l'efficacité appelée pourcentage d'élimination PE a été utilisée pour évaluer le potentiel curatif ou anti-biofilm de ces produits.

$$\text{Équation 2 : PE} = \frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \times 100\%$$

C, Absorbance du contrôle (Ligne H) ; B, Absorbance du blanc (Ligne A) ; T, Absorbance de l'échantillon traité.

Ensuite, les valeurs des taux d'élimination sont reportées en fonction de la concentration dans le milieu réactionnel en produit désinfectant déposé et en activité enzymatique par millilitre de milieu réactionnel pour les enzymes.

7. Caractérisation des EPS

7.1. EPS issus de fermentation

La fermentation bactérienne est réalisée au laboratoire de Bactériologie moléculaire de l'Institut Pasteur du Maroc, Casablanca. Elle est effectuée en flasque de 2 litres selon le protocole décrit en 2007 par Rochex et Lebeault.

7.2. Culture en fermenteur

Une suspension bactérienne standard (100 µl) est inoculée dans des flasques contenant 100 ml de bouillon nutritif stérile (LB) et 2 g de laine de verre utilisée comme surface pour la croissance du biofilm, et incubée à 37 °C durant 8 jours avec agitation continue à 100 tr/min.

Au cours de la croissance du biofilm, deux séries de cultures bactériennes sont étudiées: une série quotidiennement nourrie avec 2 ml de bouillon nutritif marqué N et une autre marquée J à jeun.

7.3. La détermination quantitative de cellules viables

Dix séries de dilutions sont faites par inoculation de 100 µl de la suspension bactérienne et cultivée en 900 µl de bouillon LB. Les aliquotes (0,1 ml) sont étalées sur des boîtes de gélose nutritifs (LB) et incubées pendant 24 à 48 h à 37°C (3 boîtes pour chaque dilution). Les cellules viables sont dénombrées et exprimées en unités formant colonie (UFC.ml⁻¹).

7.4. L'extraction des substances polymériques extracellulaires (EPS)

La méthode d'extraction est inspirée de l'étude décrite par Molobela et al en 2010.

La culture contenant de la laine de verre avec des cellules de biofilm, qui ont été fixées, est vortexée vigoureusement pendant 5 min pour détacher les cellules du biofilm faiblement lié. L'aliquote bactérienne (20 ml) est ensuite ajoutée à des tubes de 50 ml à centrifuge stériles. Le

contenu est homogénéisé pendant 30 s à l'aide d'un homogénéisateur et centrifugé à 3500 ×g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans des tubes coniques stérile et centrifugé à 9000 ×g pendant 30 min à 4 ° C. Le culot est ultérieurement remis en suspension dans 20 ml d'eau distillée stérile puis congelé et lyophilisé et après dissous dans de l'eau ultra pure. Les EPS dissous sont filtrés à travers des filtres de 0,8/0,2 µm. Les filtrats sont ensuite analysés pour déterminer la composition des EPS, en protéines et en glucides, et l'activité enzymatique.

7.5. Dosages colorimétriques

7.5.1. Dosage des glucides

La teneur en glucides est déterminée par la méthode de Gaudy (1962) avec comme standard le glucose. Le polysaccharide subit une hydrolyse totale en présence d'acide sulfurique concentré à chaud. Les monosaccharides libérés forment des dérivés de furfural dont l'absorbance est mesurée à 630 nm.

Le réactif à l'Anthrone est constitué de 0,2 g d'Anthrone dissous dans 100 ml d'une solution d'acide sulfurique concentrée à 95-97%. Ce réactif est préparé au moment du dosage et ensuite stocké à l'abri de la lumière à 4°C.

Dans des tubes en verre brûlé, 1ml d'échantillon et 2 ml de réactif à l'Anthrone sont fermés, agités et incubés au bain-marie bouillant pendant 7 min 30 s. Après refroidissement dans de l'eau glacée, l'absorbance est mesurée à 630 nm. Une gamme étalon de 0 à 50 µg de glucose est réalisée pour chaque nouveau dosage.

7.5.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines est déterminée par la méthode modifiée de Lowry (Frøelund et al, 1995) avec comme standard le sérum albumine bovin (SAB).

Le réactif est préparé de façon extemporanée en mélangeant 100 mg de bleu de coomassie brillant G250 avec 50 ml d'éthanol à 95% et avec 100 ml d'acide phosphorique à 85%. 100 µl d'échantillon sont mélangés à 5 ml de réactif dans un tube en verre brûlé. Le mélange est vortexé et incubé 5 min à température ambiante. Après incubation, l'absorbance est mesurée à 595 nm. L'étalonnage est réalisé en faisant une gamme SAB de 0 à 0,5 mg.ml⁻¹.

Chapitre III : Biofilm en microplaque

Les biofilms bactériens constituent une forme de résistance des bactéries contre les agents antibactériens. La problématique biofilm est typique chez une bactérie opportuniste ubiquitaire comme *P. aeruginosa*, *Salmonella*, *E.coli*, *Staphylococcus (aureus, warneri et sciuri)* et *Streptococcus pyogènes*. En effet, c'est la colonisation progressive de l'environnement (réseau d'eau, robinetterie,...), du secteur agroalimentaire (des appareils de production et des matériaux industriels) et des dispositifs médicaux implantables ou non sous forme de biofilm qui va conduire à la colonisation chez l'homme, puis à l'apparition d'un statut infectieux spécifique.

L'ensemble de ces éléments souligne l'intérêt de développer des études à la fois sur la compréhension des mécanismes de formation du biofilm et sur de nouvelles approches préventives et curatives avec la définition de nouveaux agents potentiellement efficaces contre les biofilms.

Cette étape de notre travail est dédiée à l'amélioration de modèles de formation de biofilms en flux continu sur microplaque, puis l'évaluation de l'activité antibactérienne de huit enzymes et quatre produits désinfectants dans le but de sélectionner la meilleure molécule « anti-adhésion » et « anti-biofilm ».

1. Modèle du secteur environnemental

Le maintien de la qualité des eaux potables de la sortie de la station de traitement jusqu'au robinet du consommateur est une préoccupation majeure des traiteurs et distributeurs d'eau. D'un point de vue biologique, ce maintien doit se caractériser par une stabilité de la croissance bactérienne. Or les réseaux de distribution d'eau potable sont continuellement exposés à un flux de matière organique biodégradable et de microorganismes provenant de l'usine de traitement, mais également d'incidents (cassures, réparations) survenant sur le réseau lui-même. Une partie de ces microorganismes (bactéries hétérotrophes en particulier) s'adapte à cet environnement oligotrophe, et peut ainsi coloniser l'ensemble d'un réseau de distribution d'eau potable. La plus forte densité des microorganismes se rencontre à la surface des matériaux supports et s'organise sous forme de microcolonies plus ou moins dispersées et mélangées à des produits de corrosion et des précipités inorganiques formant ainsi le biofilm.

Dans cette présente étude, nous avons choisi d'étudier le cas de *P. aeruginosa* sur des coupons de tuyau de distribution d'eau potable, qui est le polyéthylène, introduits dans les puits d'une microplaque de 24 puits. Les résultats de l'évaluation de la cinétique d'adhésion de *P. aeruginosa* sur le polyéthylène sont illustrés dans la figure suivante.

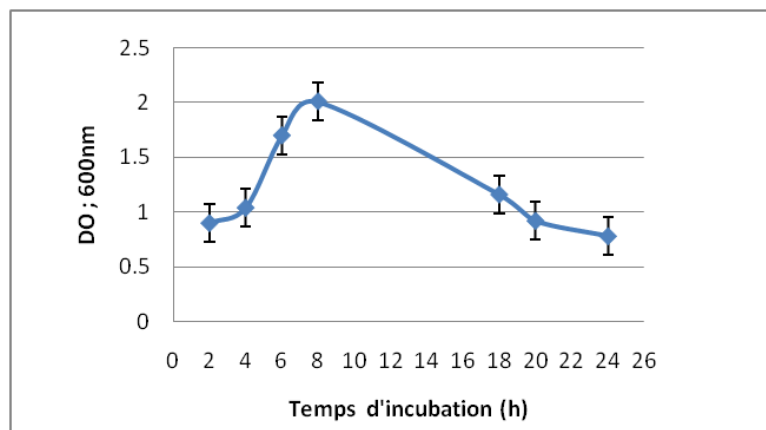


Figure 13 : cinétique de formation du biofilm par *P. aeruginosa* P59 sur des coupons cylindriques de polyéthylène.

La figure montre que le temps d'adhésion optimal pour la souche de *P. aeruginosa* P59, sur un matériel en polyéthylène, est de 8h. D'ailleurs le graphe représente bien les différentes étapes de formation de biofilm dès les premières étapes de formation de biofilm jusqu'à la phase de dispersion qui correspond à la diminution de l'absorbance de la biomasse adhérente.

2. Modèle du secteur agroalimentaire

A ce jour, la contamination des surfaces exposées à des environnements humides et non stériles, par des microorganismes demeure un des problèmes majeurs du secteur alimentaire. Cette contamination est à l'origine de formation de biofilms qui sont des amas structurés de cellules bactériennes attachées à la surface du support et enrobés d'une matrice polymérique protectrice qui les rend extrêmement résistants aux procédures de nettoyage et d'hygiène, en présentant une source de contamination permanente. En plus de ces conséquences sanitaires, les répercussions économiques des biofilms peuvent être importantes en endommageant le matériel industriel.

Dans notre étude, nous avons choisi d'étudier le cas de deux souches différentes isolées à partir des produits alimentaires. *Salmonella* spp a été choisie pour son aptitude à former le biofilm sur l'inox (un matériel tellement utilisé dans les industries agroalimentaires) utilisé dans cette étude sous forme de billes introduites dans les puits d'une microplaque de 96 puits. Nous avons également utilisé au cours de cette étude une autre bactérie de genre *Escherichia coli* qui présente des propriétés physico-chimiques de surface différentes de celle de *Salmonella* spp à savoir un caractère plus hydrophile en permettant d'adhérer plus sur le verre, qui présente aussi une surface très employée dans le secteur agroalimentaire, utilisé aussi dans cette étude sous forme de billes introduites dans les puits d'une microplaque de 96 puits employées comme surfaces sur lesquelles il y aura formation de biofilm.

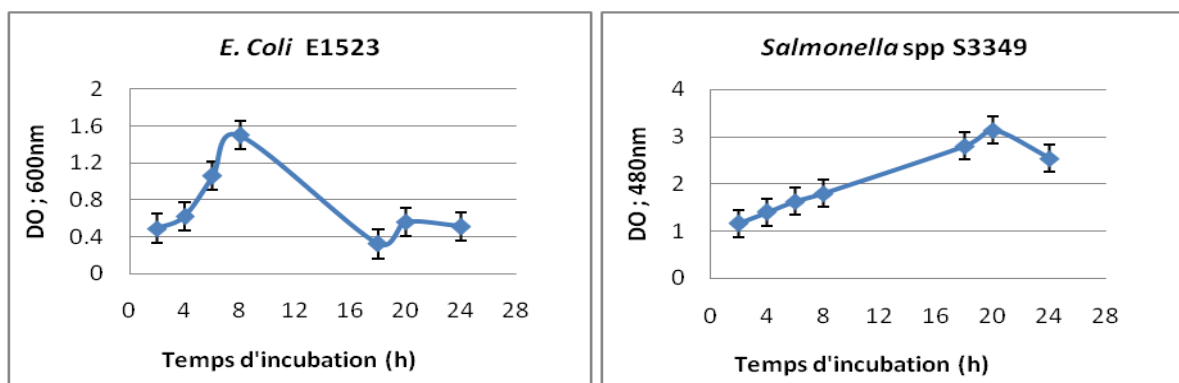


Figure 14 : cinétique de formation du biofilm par *E. coli* E1525 sur des billes de verre et par *Salmonella* spp S3349 sur des billes d'innox.

La figure 14 montre que le temps d'adhésion optimal pour la souche d'*E. coli* E1525 sur un support en verre est de 8h, et pour la souche de *Salmonella* spp S3349 sur un support en inox est de 20h. D'après ces résultats, on remarque que les graphes figurent bien les différentes étapes de formation de biofilm.

3. Modèle du secteur médical

Les propriétés d'adhésion des microorganismes sont si répandues que toute surface, en contact avec un liquide, est rapidement colonisée. On comprend donc, aisément, que les biofilms aient un impact dans de nombreux domaines. Les infections nosocomiales sont des infections relatives aux hôpitaux. Elles sont provoquées par des agents pathogènes opportunistes et touchent une population, dite à risque. On leur reconnaît deux sources majeures : les porteurs (symptomatiques ou asymptomatiques) et le milieu environnant. Ces pathogènes opportunistes ont la capacité de survivre en dehors de leurs hôtes et de résister à certains antimicrobiens (antibiotiques, désinfectants et antiseptiques), comme aux températures élevées. Ils peuvent aussi former des biofilms qui favorisent ces résistances. Aujourd'hui, les bactéries installées dans les hôpitaux sont entrainés d'acquiescer la multirésistance vu l'utilisation accrue des antibiotiques et qui vont disséminer une grande population multirésistante autour du monde. Chose qui pousse l'organisation mondiale de la santé OMS de tirer le signal d'alarme de la multirésistance qui va être le bombardement de demain. Surtout que, les biofilms présents dans les environnements hospitaliers et sur les instruments médicaux sont capables de coloniser les plaies et sont reconnus comme étant impliqués dans des infections chroniques en milieu hospitalier en présentant ainsi une source d'infections nosocomiales.

Nous avons abordé dans cette partie deux cas. Le premier cas correspond à la colonisation des environnements hospitaliers présentée par le service d'hémodialyse pour lequel nous avons choisi deux souches modèles, prélevées à partir des surfaces colonisées, qui sont *Staphylococcus warneri* et *Staphylococcus sciuri* traitées dans notre étude sur des microplaques de polystyrène de 96 puits. Le deuxième cas correspond à la colonisation des dispositifs médicaux présentée par le cathéter, pour lequel nous avons choisi deux souches modèles *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogènes*, étudiées sur des coupons de cathéter introduits sur des microplaques de 96 puits.

D'après les résultats présentés dans la figure 15, on remarque que les graphes figurent bien les différentes étapes de formation de biofilm, dès les premières étapes présentées par l'augmentation de l'absorbance de la biomasse adhérente en passant par la phase de maturation représentée par un pic de maximum d'absorbance en arrivant à la phase de dispersion figurée par la diminution de l'absorbance. La figure 15 montre que le temps d'adhésion optimal pour la souche *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 sur un support en polystyrène est de 8h, et pour la souche de *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4 sur des coupons de cathéter est de 20h et 8h respectivement.

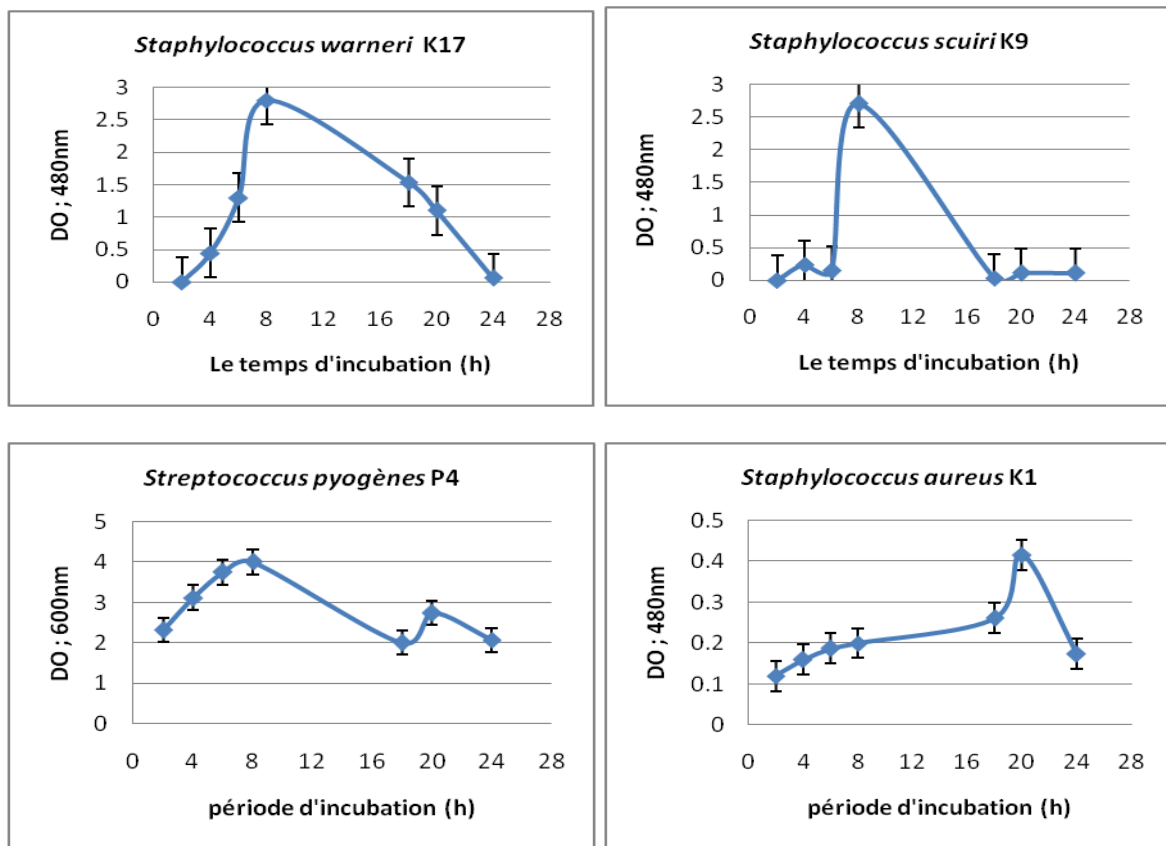


Figure 15 : Cinétique de formation du biofilm sur le polystyrène par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17, et sur des coupons de cathéter par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4.

4. Discussion

L'adhésion primaire des bactéries au support est consécutive à la formation d'un voile chimique en surface du substrat. Le milieu environnant et les conditions physico-chimiques peuvent en effet modifier les propriétés de surface du substrat et le rendre plus ou moins attirant pour les bactéries. Une fois que ce voile chimique est formé, les bactéries planctoniques présentes dans l'environnement peuvent se fixer au support. Dans un premier temps, cette adhésion primaire est réversible, et les bactéries ont la capacité de se détacher du support pour revenir au stade planctonique. Puis, cette adhésion devient irréversible car ce passage d'une vie libre (planctonique) à une vie fixée entraîne de nombreuses modifications de l'expression génétique bactérienne qui mènent à des modifications phénotypiques (Islam et al, 2012). À ce stade, les bactéries fixées perdent certaines de leurs structures de mobilité (flagelle notamment) pour produire des facteurs d'adhérence comme les curli, les pili, etc. Certaines molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts cellule-surface et des contacts cellule-cellule (Lemon, 2008). Chez certaines souches de *Streptocoques*, des protéines exprimées à la surface des bactéries, entre autres la protéine Bap, favorisent les

contacts entre cellules et contribuent à la synthèse de la matrice extracellulaire (Lasa et Penadés, 2006). Ainsi, la multiplication de ces bactéries fixées conduit à la formation de microcolonies. Les bactéries de ces colonies vont alors développer une matrice d'exopolysaccharides (EPS) qui leur offrira une protection contre divers stress environnementaux (déshydratation, limitation nutritionnelle, présence d'antimicrobiens, etc.). C'est l'ensemble de ces éléments qui explique nos résultats en présentant les premières étapes de formation de biofilm par l'augmentation de l'absorbance de la biomasse adhérente jusqu'à avoir un pic qui peut être expliquée par la multiplication des colonies conduisant à la formation de biofilms structurés matures. Des canaux formés par la structuration en trois dimensions vont permettre au milieu liquide environnant de circuler et d'apporter les nutriments à une plus grande surface du biofilm (Proft et Baker, 2009). Suivant la puissance et les perturbations du flux liquide environnant, de petits amas de bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et se trouver entraînés ailleurs. En fonction des conditions environnementales, ces amas peuvent se disloquer et les bactéries les composants peuvent aller coloniser d'autres surfaces et y créer de nouveaux biofilms. Cette phase de dispersion est bien présentée dans nos résultats par la diminution de l'absorption de la biomasse adhérente, qui s'explique d'une part par le détachement et la mort cellulaire due à la diminution de la quantité de nutriments. D'autre part, Allison et al. (1998) ont montré, que dans un biofilm constitué de l'espèce *P. fluorescens*, la diminution de la quantité de nutriments entraîne la sécrétion d'un polysaccharide lyase qui dégrade la matrice du biofilm, facilitant ainsi la libération des bactéries.

La mort des cellules du biofilm, fait aussi partie, du processus de renouvellement et de dispersion de la biomasse. Un mécanisme original, régissant l'autorégulation de la population des biofilms est proposé par Webb et al. (2003). Ces auteurs ont observé que, dans un biofilm constitué de l'espèce *P. aeruginosa*, la mort, d'un grand nombre de cellules, intervient régulièrement. Dans les effluents provenant du biofilm ils ont détecté un phage filamenteux capable d'infecter et de lyser une partie de la population du biofilm, tandis que l'autre partie des cellules semble résistante. Ce phage étant présent sous forme de prophage dans le génome de *P. aeruginosa*, les auteurs formulent l'hypothèse, qu'il constituerait un mécanisme de différenciation des cellules à l'intérieur des microcolonies, facilitant la dispersion d'une sous population résistante à la lyse (Webb et al. 2003). ceci explique nos résultats expérimentaux obtenus, puisqu'il y a augmentation apparente de la densité optique après un certain temps, qui correspond par exemple à un temps d'incubation de 20h pour *E. coli* E1523 et *S. pyogenes* P4, signalant qu'il ya une dispersion bien apparente des souches testées.

Chapitre IV : Potentiel antimicrobien des désinfectants

1. Activité désinfectante contre des bactéries planctoniques

1.1. Concentration minimale inhibitrice CMI

Nous avons testé l'activité inhibitrice de quatre produits désinfectants, à différentes concentrations, contre sept bactéries pathogènes, à l'état planctonique. Cette phase est indispensable pour la mise en évidence éventuelle d'un effet spécifique préventif (anti-adhésion) et curatif (anti-biofilm) des biofilms à une concentration infra-inhibitrice de croissance.

Les résultats de l'activité antibactérienne de ces différents composés sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Seuil d'efficacité (Concentration Minimale Inhibitrice) de quatre produits désinfectants sélectionnés contre sept bactéries pathogènes.

Concentration minimal inhibitrice CMI pour chaque bactérie testée (%)							
	<i>P. aeruginosa</i> P59	<i>Salmonella</i> spp S3349	<i>E. coli</i> E1523	<i>S. warneri</i> K9	<i>S. sciuri</i> K17	<i>S. aureus</i> K1	<i>S. pyogènes</i> P4
Désinfectant P1	0.25	0.062	0.125	0.5	0.5	0.125	0.25
Désinfectant P2	0.25	0.062	0.062	0.5	0.5	0.031	0.125
Désinfectant P3	0.5	0.125	0.125	0.5	0.5	0.125	0.5
Désinfectant P4	0.125	0.062	0.031	0.125	0.125	0.015	0.125

D'après ces résultats, chaque produit testé possède une action spécifique qui varie selon les microorganismes, avec une efficacité inhibitrice qui diffère aussi selon la nature chimique du composé testé. A noter que le produits P4 présente les plus faibles valeurs de CMI, d'où son grande efficacité sur les bactéries en suspension.

Les résultats des CMI montrent, évidemment, que les sept souches sont sensibles aux produits testés. À titre de comparaison, on constate que le produit avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre est le désinfectant P4, son efficacité est expliquée par sa composition riche en molécules, appartenant à trois classes de désinfectants (alcool, ammonium quaternaire et biguanide), avec des composés détergents (surfactant, séquestrant et

dispersant). Plusieurs études (Ebrahimi et al, 2014 ; Massicotte, 2009) ont montré que les biguanides forment des liaisons avec les acides gras et les groupes phosphates de la membrane cellulaire en provoquant ainsi une fuite des constituants cellulaires, et par conséquent coagulation du cytosol. Tandis que les composés alcooliques agissent, en dénaturant les protéines cytoplasmiques et membranaires, et en inhibant la synthèse des acides nucléiques et des protéines (Allion, 2004). De part leur propriétés physico-chimique, les composés d'ammonium quaternaire peuvent s'adsorber de manière irréversible aux phospholipides et aux protéines de l'enveloppe bactérienne. Cette adsorption entraîne, alors, des changements de perméabilité puis des lésions de la membrane cytoplasmique conduisant à une fuite des constituants cytoplasmiques (notamment les ions potassium). Leur balance hydrophile-lipophile déterminé par la longueur de la chaîne alkylée est un facteur clé de leur efficacité (IUPAC Recommandations 1995). La combinaison entre ces trois principes actifs explique l'activité inhibitrice importante du produit P4.

Le désinfectant P2 est classé après le produit P4, il est à base de l'eau oxygénée H_2O_2 ce qui explique son effet inhibiteur. Son mécanisme d'action consiste en l'oxydation en influençant sur la production des radicaux libres qui interagissent avec les lipides, les protéines et l'ADN. Ensuite, le produit P1 vient en troisième position après le produit P2 son efficacité est expliquée par sa composition en éthanol et le propanol appartenant à la classe des alcools connus pour leur efficacité contre les bactéries (McDonnell et Russell, 1999). Plusieurs études ont montré que les composés alcooliques agissent en dénaturant les protéines, comme les solvants ou les agents de déshydratation (Dorman et Deans, 2000).

Tandis que, le produit P3 vient en dernier lieu, en termes d'activité antibactérienne, en signalant que l'hypochlorite de sodium agit, par halogénéation des protéines membranaires et chromosomiques, en provoquant leur destruction (Massicotte, 2009).

En conclusion, la sensibilité des sept souches, aux quatre produits testés, explique leur efficacité sur des bactéries planctonique.

1.2. Concentration minimale bactéricide CMB

Nous avons testé l'activité bactéricide des quatre produits désinfectants, à des concentrations supérieures à celles de la CMI, contre les sept bactéries pathogènes, à l'état planctonique. Cette phase est indispensable, en complétant les résultats de la CMI nécessaires, pour la mise

en évidence éventuelle, d'un effet spécifique, préventif (anti-adhésion) et curatif (anti-biofilm) des biofilms par ces désinfectants.

Les résultats de l'activité bactéricide de ces différents composés sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Seuil d'efficacité (Concentration Minimale Bactéricide) de quatre produits désinfectants sélectionnés contre sept bactéries pathogènes (- : pas d'action bactéricide).

Concentration minimal bactéricide CMB pour chaque bactérie testée (%)							
	<i>P. aeruginosa</i> P59	<i>Salmonella</i> spp S3349	<i>E. coli</i> E1523	<i>S. warneri</i> K9	<i>S. sciuri</i> K17	<i>S. aureus</i> K1	<i>S. pyogènes</i> P4
Désinfectant P1	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Désinfectant P2	0.5	0.5	-	0.5	-	-	-
Désinfectant P3	0.5	-	0.5	0.5	-	-	-
Désinfectant P4	0.25	0.125	0.125	0.125	0.25	0.125	0.25

D'après ces résultats, chaque produit testé possède une action spécifique qui varie selon les microorganismes, avec une efficacité inhibitrice qui diffère aussi selon la nature chimique du composé testé. Il est à noter que seule le produit P4 présente un effet bactéricide pour toutes les souches étudiées avec les plus faibles valeurs notées de CMB, d'où sa grande efficacité bactéricide sur les bactéries planctoniques. Tandis que, le produit P1 est classé après le désinfectant P4. Alors que les produit P2 et P3 viennent en dernier lieu, en termes d'activité bactéricide.

L'activité bactéricide du produit P4 est expliquée par sa composition en trois principes actifs reconnus pour leur effet bactéricide : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide. Les biguanides ont une activité antimicrobienne puissante contre la plupart des bactéries gram positives et certaines bactéries Gram négatives, mais n'ont pas d'activité létale contre les spores (Ebrahimi et al, 2014). Une solution aqueuse de biguanides de 0,1% est bactéricide contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et en 15 secondes. Cependant, il est relativement inefficace contre d'autres organismes gram-négatives, les champignons, les spores, et la plupart des virus (Ebrahimi et al, 2014). Dans les organismes sensibles, le biguanide perturbe la membrane cytoplasmique, son activité est potentialisée par

l'alcool, ce mélange de biguanide-alcool est particulièrement efficace parce qu'il combine la rapidité antiseptique de l'alcool à la persistance de biguanide (Massicotte, 2009). L'addition de l'ammonium quaternaire au mélange de biguanide-alcool a renforcée l'activité bactéricide du produit P4 sur la totalité des souches testées.

Le désinfectant P1 présente une activité bactéricide aussi importante qui reste inférieure à celle du produit P4. Cette activité est expliquée par sa composition riche en deux molécules alcoolique reconnues par leur activité bactéricide sur les bactéries Gram+ et Gram - en agissant rapidement à environ 30 secondes (Massicotte, 2009). Leur usage est recommandé par l'OMS dans le cadre du plan de lutte contre les infections nosocomiales. Il est recommandé aussi dans la pratique des soins de santé. Leur utilisation en remplacement ou en complément du lavage chirurgical se généralise dans les blocs opératoires.

Alors que, le produit P2 (principe actif : peroxyde d'hydrogène) présente une efficacité bactéricide plus limitée que le produit P1 et P4. Son mécanisme d'action consiste en l'oxydation des groupes sulfhydriles et des doubles liaisons des enzymes des bactéries, en provoquant une modification de la conformation des protéines formant ces enzymes, avec la perte de leur fonction, et par conséquent, la mort cellulaire (Massicotte, 2009). Le peroxyde d'hydrogène possède quelques caractéristiques qui en font un bon désinfectant : c'est un produit à grand pouvoir oxydant, ce qui le rend très réactif face à la matière organique, et ce qui lui donne un vaste spectre d'activité vis à vis des microorganismes : il a un bon pouvoir bactéricide. Les microorganismes anaérobies sont mêmes plus sensibles à l'action de ces produits, étant donné qu'ils ne sont pas capables de synthétiser la catalase, une enzyme qui peut décomposer le peroxyde. Ce fort pouvoir oxydant assure une grande vitesse d'action, même si, à cause de cette même caractéristique, il est recommandé que des produits stabilisants soient ajoutés dans la formulation. Donc la stabilisation du peroxyde d'hydrogène lui renforce son efficacité bactéricide, ce qui explique l'efficacité bactéricide limitée du produit P2.

Tandis que, le désinfectant P3 (principe actif : d'hypochlorite de sodium) possède une activité bactéricide moins importante que les produits P1 et P4. Bonnard (2010) a montré que suivant la concentration en hypochlorite de sodium et le temps de contact avec les micro-organismes, l'action pourra être majoritairement inhibitrice (action sur les fonctions aminées des micro-organismes) ou destructrice (lyse des cellules par pénétration jusqu'au cytoplasme) ou une combinaison des deux. Selon les normes européennes relatives aux désinfectants, l'eau de Javel a été reconnue comme bactéricide, fongicide, sporicide et virucide.

2. Activité désinfectante contre des bactéries en biofilm

Nous avons choisi d'étudier l'effet de préparations désinfectantes commerciales sur le biofilm. Leur utilisation en prévention comme en lavage permettrait d'éliminer les molécules organiques impliquées dans la formation, la cohésion et le développement des biofilms. Nous avons choisi de nous tourner vers l'utilisation de désinfectants commerciaux qui présentent l'intérêt d'être déjà caractérisés et produits en quantités industrielles.

Les caractéristiques des différentes préparations désinfectantes commerciales que nous avons choisies d'utiliser sont répertoriées dans le Tableau 4 du chapitre 2 paragraphe 1.1. Les désinfectants sélectionnés font partie de la classe des alcools, oxydants, chlores et un produit qui combine trois principes actifs (l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.1. Potentiel préventif (anti-adhésif) des quatre désinfectants analysés

Les produits ont été testés sur la formation de biofilm développé sur des supports différents (verre, inox, cathéter, polystyrène et tuyau de polyéthylène) introduits en microplaque selon le protocole de prévention d'un biofilm et les résultats sont reportés sur les figures 16 et 17. Ils sont testés dans une gamme de concentration de 1/128 à 1/2 avec des dilutions au demi en série, un triplicata étant réalisé par concentration.

L'ensemble des résultats, présentés dans les figures 16 et 17, nous permet de comparer l'efficacité des différents produits entre eux. Concernant les produits analysés, il apparaît que le produit P4 est beaucoup plus efficace que les autres produits (P1, P2 et P3). Le produit P4 étant un désinfectant à trois principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide, alors que les autres produits ne contiennent qu'un seul principe actif. Les résultats sont donc corrélés avec ceux de la CMI et la CMB des produits testés en termes d'échelle d'efficacité.

Il apparaît aussi que *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 semblent les plus sensibles (figure 16 et 17). En effet, l'effet anti-adhésion des produits testés vis-à-vis du biofilm formé par ces deux souches, montre qu'avec la plus faible dilution (1/128) les quatre produits (P1, P2, P3 et P4) inhibent plus de 83% de biofilm. Or, en augmentant de concentration jusqu'à la dilution 1/2 l'effet anti-adhésif dépasse les 95% pour l'ensemble des produits et devient plus important avec 98% d'inhibition avec le produit P4, et une sensibilité plus marquée pour *S. sciuri* K17 que *S. warneri* K9. Tandis que les autres souches semblent

plus ou moins sensibles selon la composition chimique de chaque désinfectant étudié, avec des sensibilités inférieures à 80%.

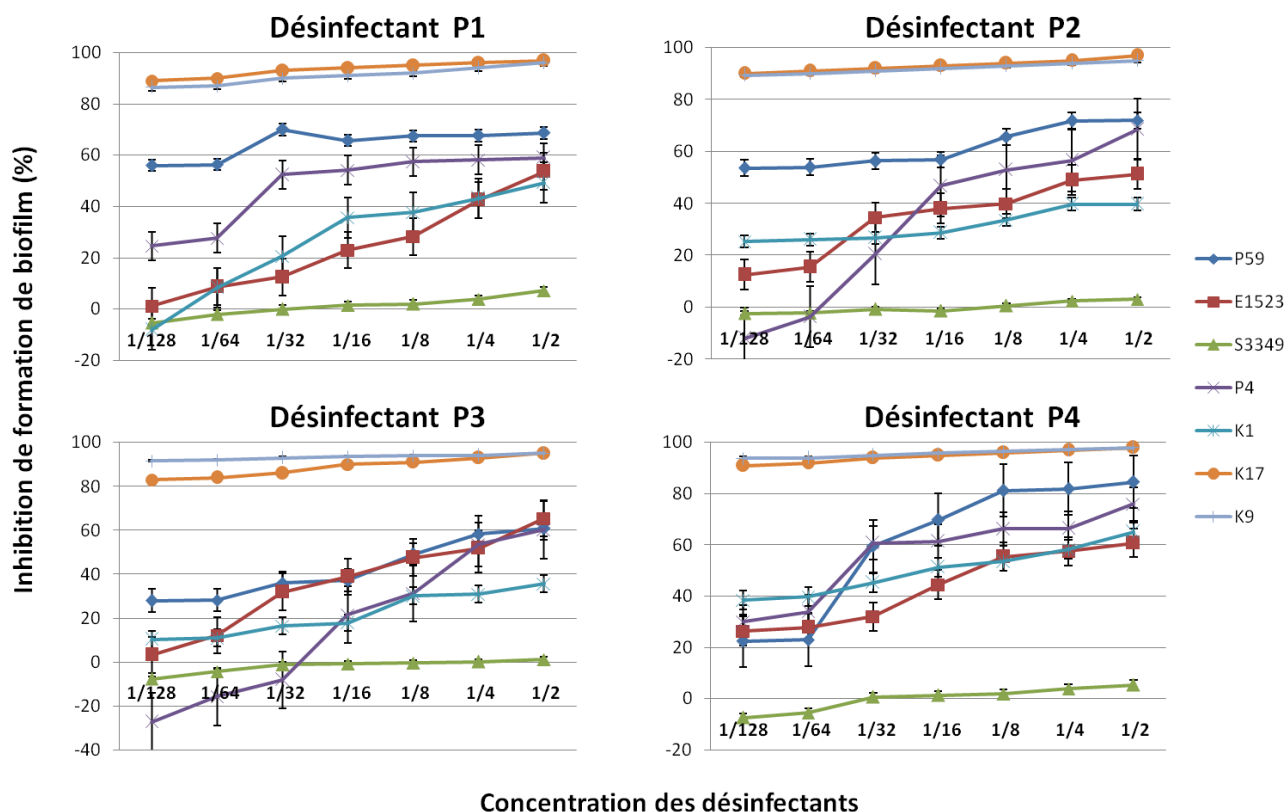


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du biofilm de sept souches bactériennes présentant trois secteurs différents (secteur agroalimentaire : présenté par *E. coli* E1525 sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 sur des billes d'inox ; secteur médical : présenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogenes* P4 sur des coupons de cathéter ; secteur environnemental : présenté par *P. aeruginosa* P59 sur des coupons cylindriques de polyéthylène) en fonction de la concentration pour les 4 produits testés. Chaque produit est présenté individuellement pour les sept souches étudiées. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

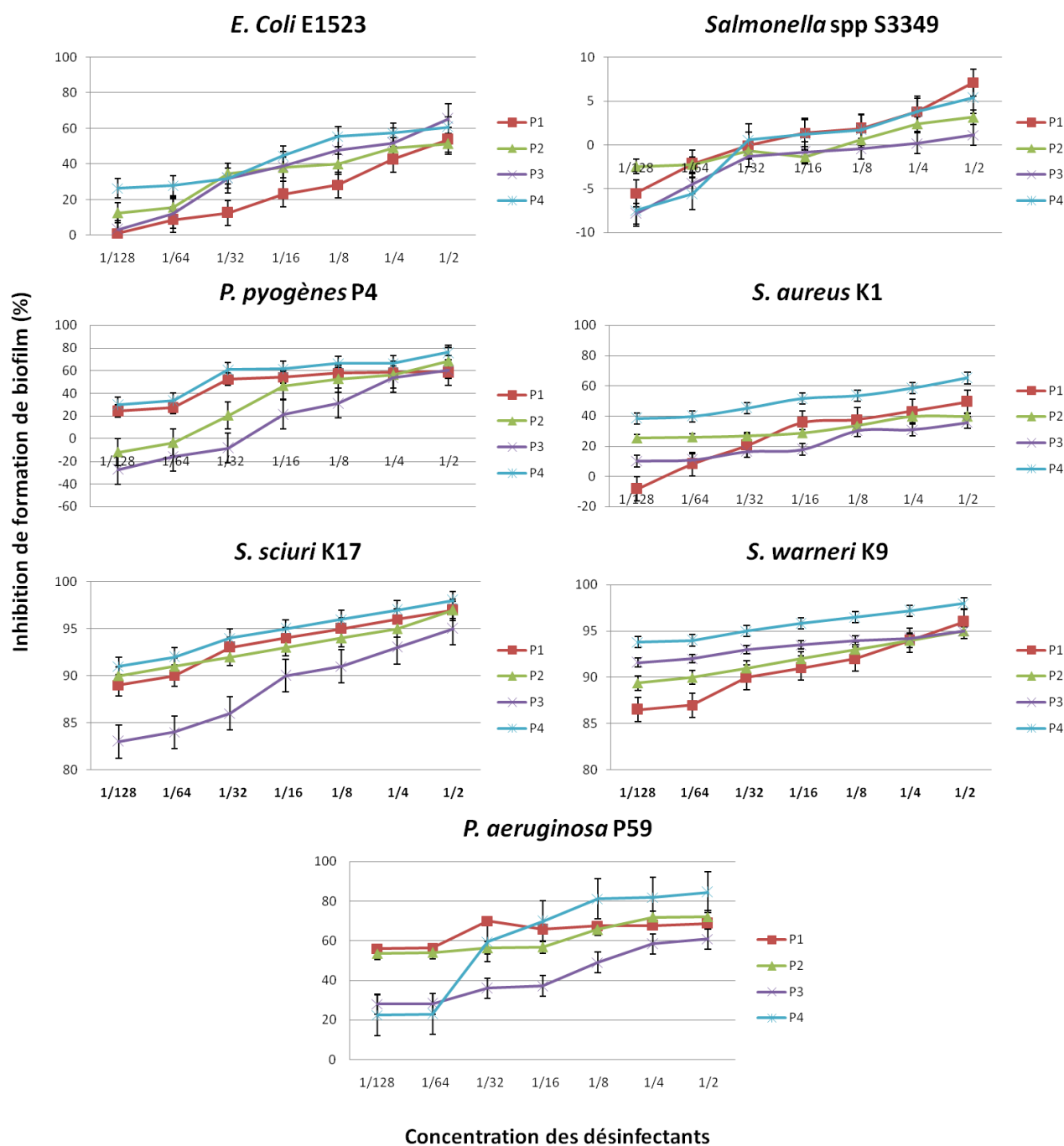


Figure 17 : Pourcentage d’inhibition du biofilm de sept souches bactériennes présentant trois secteurs différents (secteur agroalimentaire : présenté par *E. coli* E1525 sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 sur des billes d’in inox ; secteur médical : présenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4 sur des coupons de cathéter ; secteur environnemental : présenté par *P. aeruginosa* P59 sur des coupons cylindriques de polyéthylène) en fonction de la concentration pour les 4 produits testés. Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d’hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l’alcool, l’ammonium quaternaire et le biguanide).

L'efficacité inhibitrice de formation de biofilm, de chaque désinfectant, augmente en parallèle avec la concentration du produit testé (figures 16 et 17). Cette activité anti-adhésion reste toujours limitée par la résistance de la souche étudiée. Malgré la sensibilité des sept souches étudiées à la bactéricidie de certains produits testés à l'état planctonique (Tableaux 9 et 10), on constate (d'après les figures 16 et 17) que ces souches présentent une certaine résistance à des concentrations qui correspondent à celles de la CMI et la CMB et même celles supérieures en formant le biofilm avec une condensation qui reste inférieure à l'état normal (formation de biofilm en absence du désinfectant). Certaines concentrations activent la formation du biofilm en notant que plus on diminue la concentration en produit (appelé : concentrations sublétales de désinfectant), plus la formation du biofilm s'active et se stimule, plus que la normale pour certaines souches, comme *Salmonella* spp S3349, *S. aureus* K1 et *S. pyogènes* P4 sur leur support correspondant. Les cellules de biofilm ont donc développée des réponses adaptatives à des concentrations sublétales de désinfectant. En effet, les cellules noyées dans la matrice du biofilm sont bien connues pour exprimer des phénotypes qui diffèrent de ceux de leurs homologues planctoniques, et afficher des propriétés spécifiques, y compris une résistance accrue, aux traitements biocides.

Nous avons donc montré, au cours de ces différentes études, que la sensibilité des bactéries testées à la bactéricidie de certains produits désinfectants à l'état planctonique n'a pas inhibé la synthèse de biofilm qui constitue pour elle une méthode d'échappement et de défense aux conditions hostiles (la bactéricidie des désinfectants). En effet, à l'état planctonique aucune croissance bactérienne n'est apparente pour la CMB (Tableaux 10), tandis que l'analyse de biofilm pour la même concentration, et même pour des concentrations supérieures à la CMB, nous a permis de trouver un certain pourcentage de formation de biofilm. Dans ce cas, la bactérie présente deux phénotypes pour la même concentration (\geq CMB) (Tableau 10) : bactérie absente (morte) à l'état planctonique, alors qu'elle est présente en biofilm où elle entre dans une phase de latence qui présente pour cette bactérie une forme de persistance et de subsistance. Par conséquent, on peut suggérer que les changements induits par l'adhésion cellulaire peuvent conduire à l'apparition de plusieurs phénotypes de résistance, à l'état biofilm.

Tableau 10 : le phénotype des sept bactéries testées pour les concentrations supérieures ou égales à la CMB des quatre désinfectants étudiés. Avec : (P1) : désinfectant P1; (P2) : désinfectant P2; (P3) : désinfectant P3; (P4) : désinfectant P4 ; (P) : planctonique ; (B) : biofilm ; (-) : bactérie absente ; (+) : bactérie présente. Dans le cas où la bactérie est présente à l'état planctonique cela indique que le désinfectant correspondant n'est pas bactéricide pour cette souche bactérienne.

	<i>P. aeruginosa</i> P59		<i>Salmonella</i> spp S3349		<i>E. coli</i> E1523		<i>S. warneri</i> K9		<i>S. sciuri</i> K17		<i>S. aureus</i> K1		<i>S. pyogènes</i> P4	
	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B
	P1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
P2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
P3	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
P4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

2.2. Potentiel anti-biofilm des quatre désinfectants analysés

Les produits ont été testés sur le biofilm, déjà développé, sur des supports différents (verre, inox, cathéter, polystyrène et tuyau de polyéthylène), introduits en microplaque, selon le protocole de lavage d'un biofilm. Ils sont testés dans une gamme de concentration de 1/128 à 1 (produit pur) avec des dilutions au demi en série, un duplicat étant réalisé par concentration.

2.2.1. Potentiel anti-biofilm contre *P. aeruginosa* P59

On constate que, dès les dix premières minutes, avec les plus faibles dilutions, le taux d'élimination du biofilm de *P. aeruginosa* P59, développé sur des coupons cylindriques de polyéthylène, est supérieur à 40% pour les quatre produits (figure 18).

Cette efficacité anti-biofilm accroit en augmentant la concentration en produit, jusqu'à avoir un plateau. En ce qui concerne la solution mère, le taux d'élimination des quatre produits est inférieur à 80%, avec une activité plus marquée pour le produit P4 (79%) qui combine trois principes actifs (l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide) jugeant sa haute efficacité, suivi par le produit P1 à base d'alcool et P3 à base d'hypochlorite de sodium (72%), alors que le produit P2 à base du peroxyde d'hydrogène vient à la fin, en terme d'efficacité (62%). On note aussi, que le prolongement du temps de traitement n'a pas une grande influence sur

l'efficacité anti-biofilm des quatre produits sur le biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur des coupons cylindriques de polyéthylène.

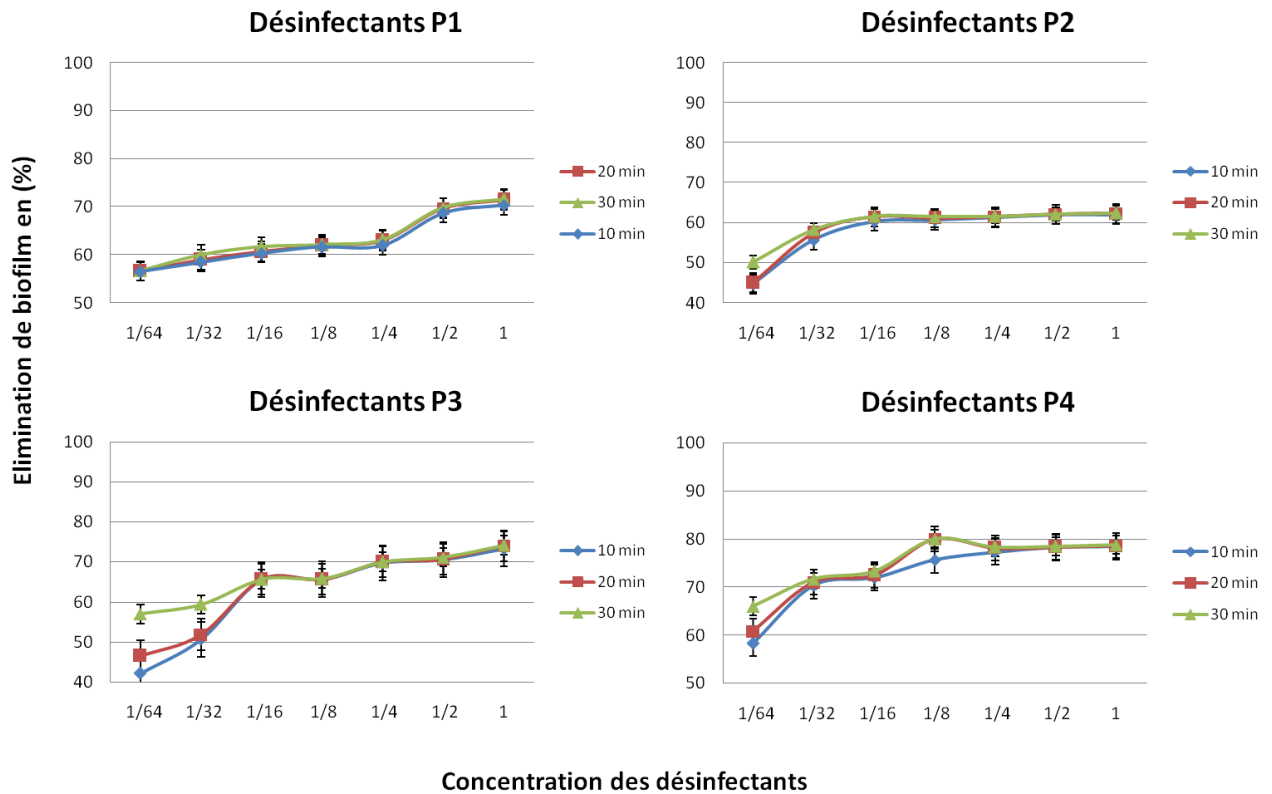


Figure 18 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur des coupons cylindriques de polyéthylène en fonction de la concentration des quatre produits testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.2.2. Potentiel anti-biofilm contre *E. coli* E1523

On remarque que la plus grande efficacité anti-biofilm, notée pour les désinfectants P1 et P3, n'a pas dépassé 50% même après 30 min de traitement avec la solution mère sans dilution (figure 19).

Ces résultats montrent la résistance marquée du biofilm d'*E. coli* E1523 développé sur le verre. D'ailleurs l'efficacité des produits P1 et P3 se rapproche en terme d'activité suivi par le produit P4 et P1. Leur effet augmente avec la concentration en produit sauf le produit P1 qui présente un diagramme presque sous forme de plateau allant de 30% avec la plus faible

dilution à 35% avec la solution mère. Tandis que le prolongement du temps de traitement n'a pas exercé une grande influence sur l'efficacité des produits testés sauf, pour le produit P1, dont l'efficacité anti-biofilm, contre le biofilm d'*E. coli* E1523, développé sur le verre, augmente avec le temps de traitement.

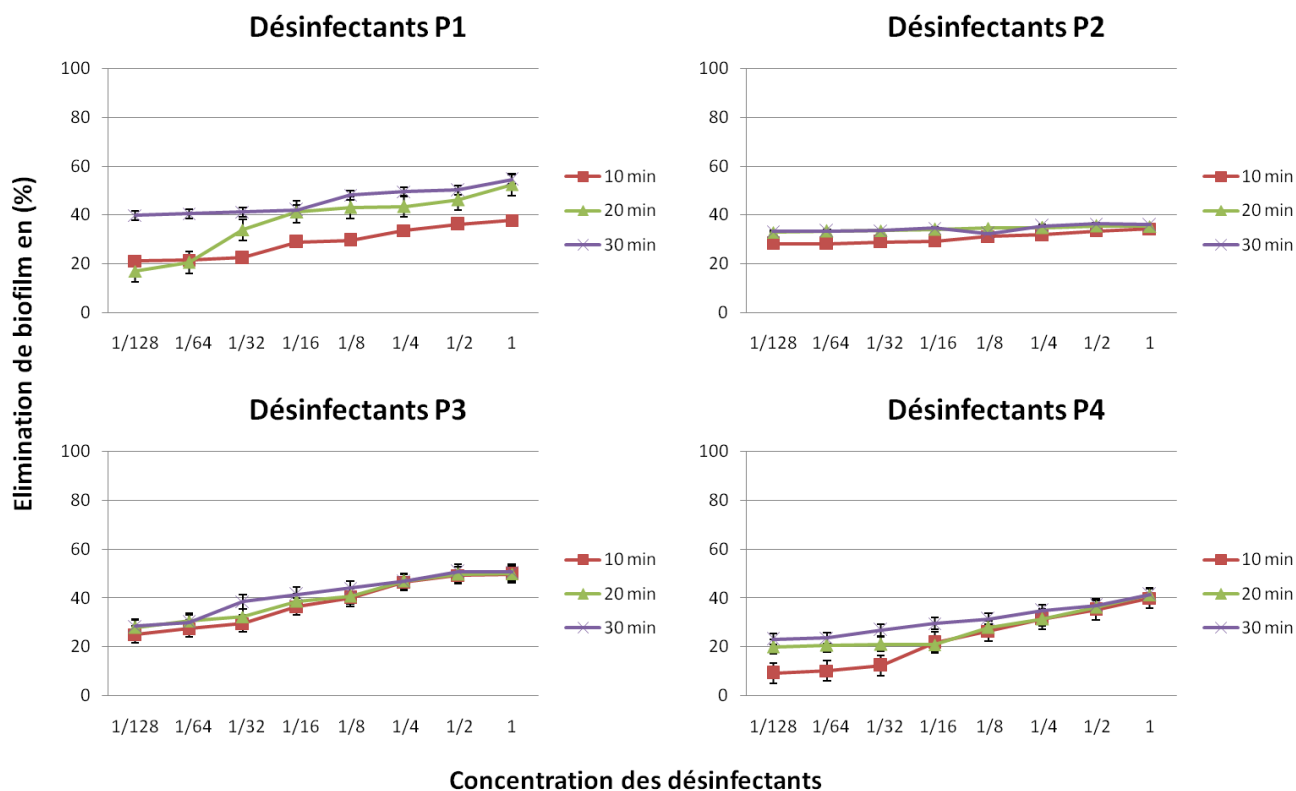


Figure 19 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *E. coli* E1523 développé sur des billes de verre en fonction de la concentration pour les 4 produits testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.2.3. Potentiel anti-biofilm contre *Salmonella* spp S3349

Le diagramme des quatre produits analysés sur le biofilm de *Salmonella* spp S3349 (Figure 20), développé sur des billes d'inox, montre bien la grande résistance de cette souche en biofilm puisque l'efficacité même des quatre produits en solutions mères n'a pas dépassée 30%. En effet leur activité anti-biofilm augmente avec la concentration en produit et en allongeant le temps de traitement, mais d'une manière figurative.

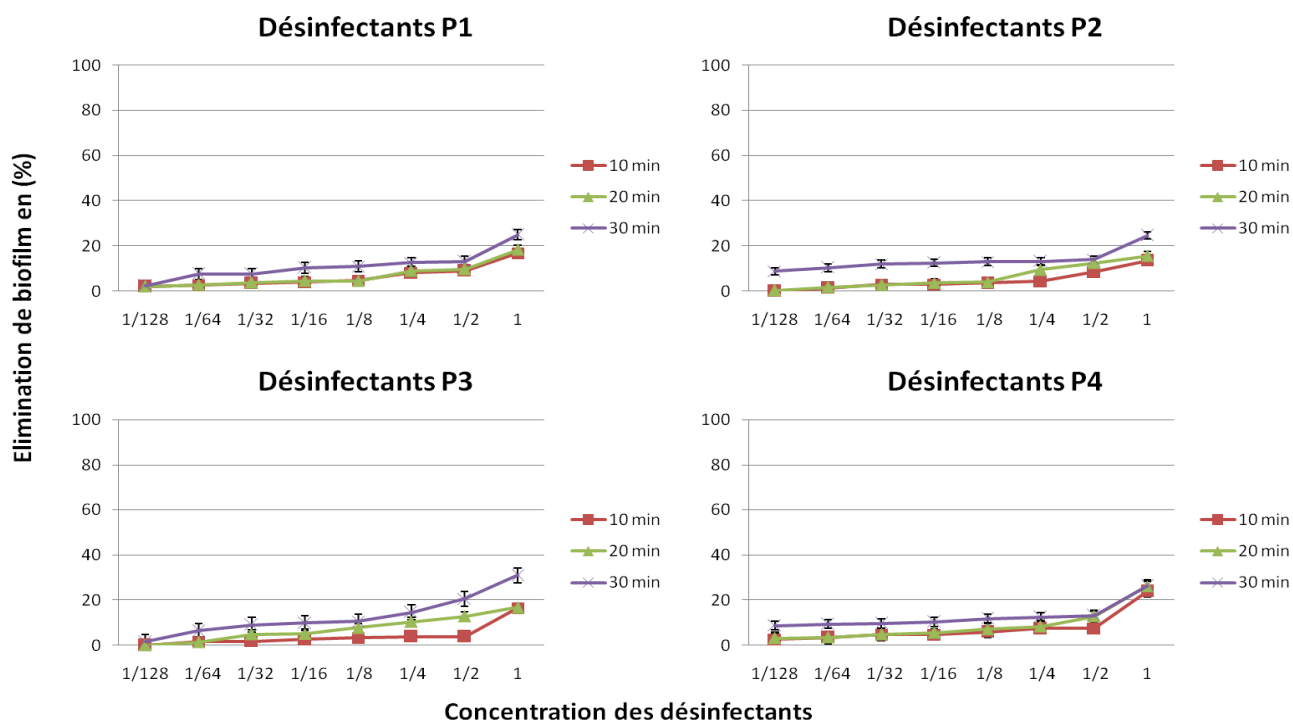


Figure 20 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur des billes d'inox en fonction de la concentration pour les 4 produits testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.2.4. Potentiel anti-biofilm contre *S. pyogènes* P4

Dès les dix premières minutes avec les plus faibles dilutions, le taux d'élimination du biofilm de *S. pyogènes* P4 développé sur des coupons de cathéter est constaté supérieur à 40% pour les produits P1 et P4, et supérieur à 20% pour le produit P3, alors qu'il est de 0% pour le produit P2 (figure 21).

Cette efficacité anti-biofilm accroît avec la concentration en produit jusqu'à avoir un plateau. En ce qui concerne la solution mère, le taux d'élimination des quatre produits est inférieur à 86% après 30 min de traitement avec une activité plus marquée pour le produit P4 (86%) combinant entre 3 principes actifs (l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide) jugeant sa haute efficacité, suivi par P3 (82%) à base d'hypochlorite de sodium, puis le produit P1 à base d'alcool (79%) alors que le produit P2 à base du peroxyde d'hydrogène vient en dernier lieu en terme d'efficacité (60%). On note aussi, que le prolongement du temps de traitement exerce une grande influence sur l'efficacité anti-biofilm des quatre produits sur le biofilm de

S. pyogènes P4 développé sur des coupons de cathéter puisqu'il augmente le taux d'élimination de ce dernier.

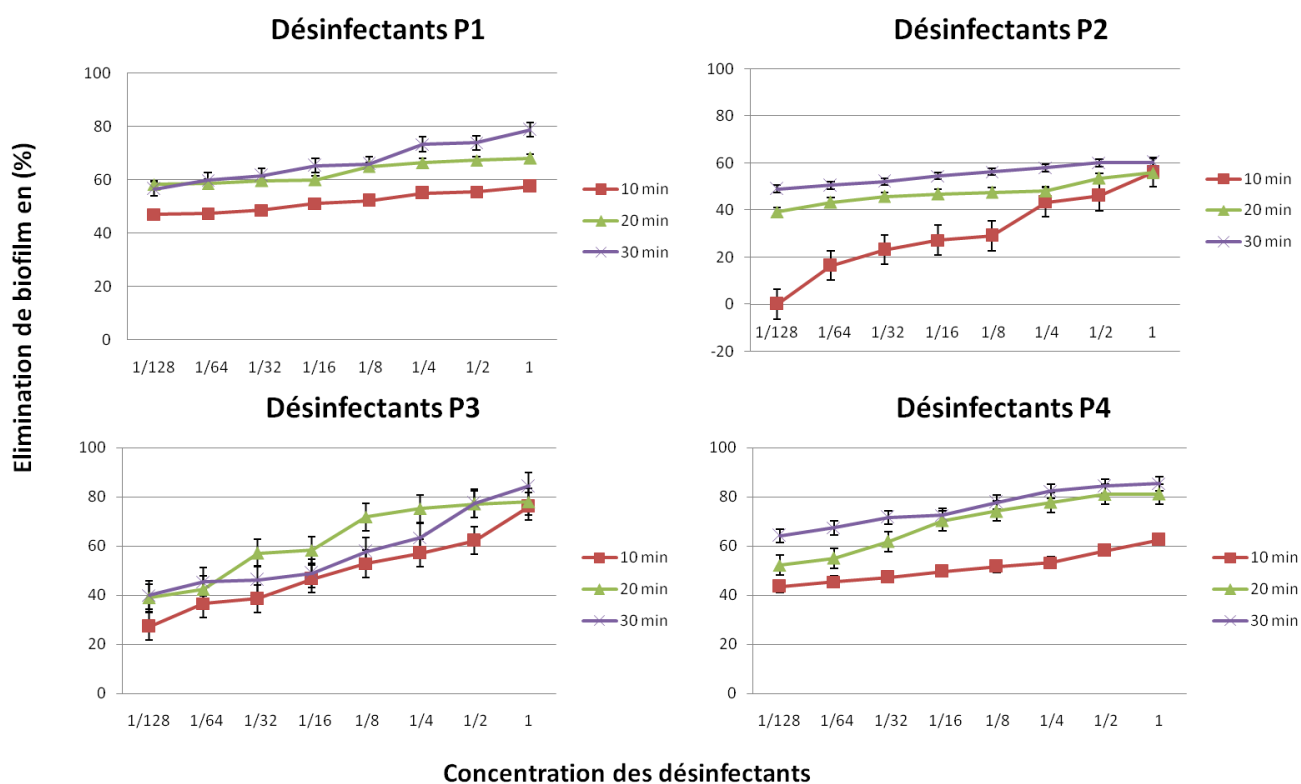


Figure 21 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. pyogènes* P4 développé sur des coupons de cathéter en fonction de la concentration pour les 4 produits testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.2.5. Potentiel anti-biofilm contre *S. aureus* K1

Le produit P4 présente une grande efficacité anti-biofilm remarquée contre le biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter, même avec la plus faible concentration, montrant un taux d'élimination de 70% après 10 min de traitement (figure 22). Ce taux augmente avec la concentration jusqu'à 92% avec la solution mère du produit.

Tandis que le produit P2 vient en deuxième position après le produit P4 en terme d'activité, On remarque aussi que, le prolongement du temps de traitement exerce une grande influence sur l'efficacité anti-biofilm des quatre produits sur le biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter, puisqu'il augmente le taux d'élimination de ce dernier, en notant que le temps de traitement optimal pour avoir le maximum d'effet correspond à 20 min.

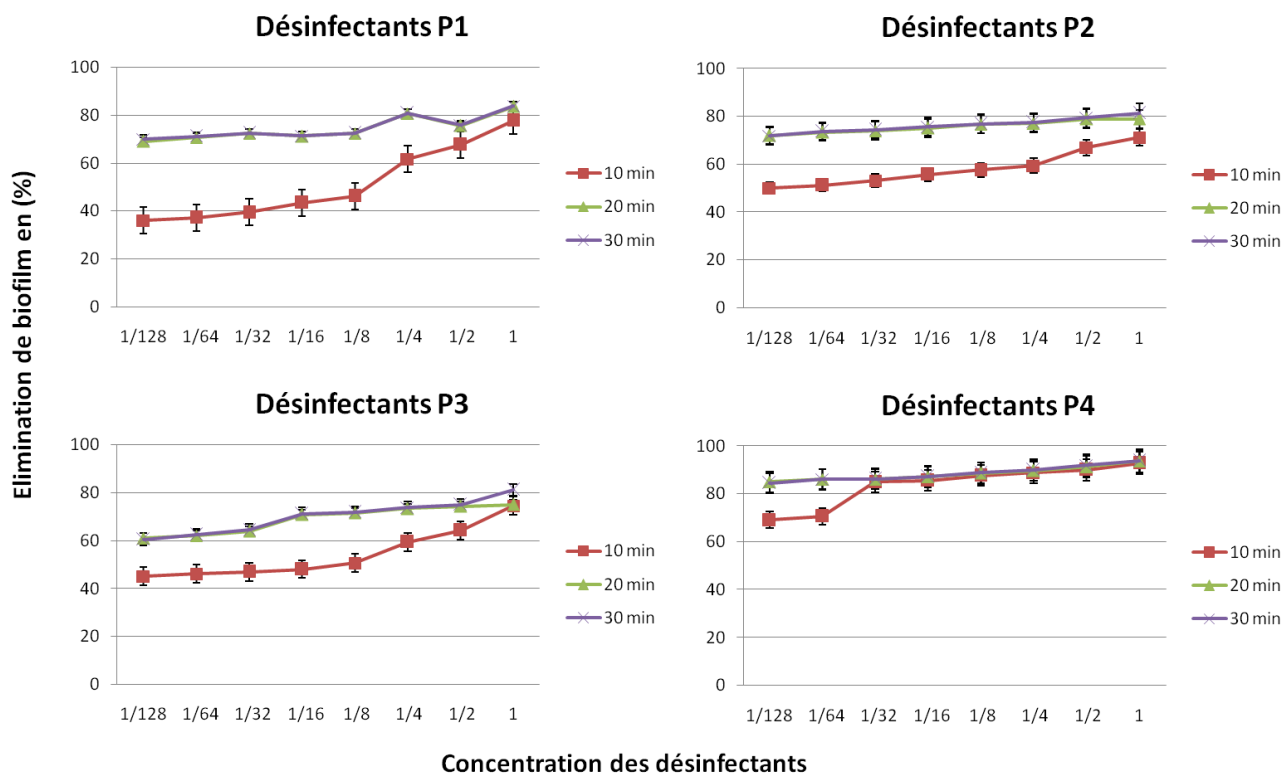


Figure 22 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter en fonction de la concentration pour les 4 produits testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.2.6. Potentiel anti-biofilm contre *S. sciuri* K17

On remarque, d'après la figure 23, que dès les dix premières minutes avec les plus faibles dilutions, le taux d'élimination du biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur le polystyrène est inférieur à 15% pour les quatre produits. Cette efficacité anti-biofilm augmente en augmentant la concentration en produit jusqu'à avoir un plateau.

On note aussi que, le prolongement du temps de traitement améliore l'efficacité anti-biofilm des quatre produits sur ce biofilm de *S. sciuri* K17. En ce qui concerne la solution mère, le taux d'élimination des quatre produits est inférieur à 70% après 30 min de traitement avec une activité plus marquée pour le produit P4 (70%) qui combine entre 3 principes actifs (l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide), suivi par le produit P1 à base d'alcool et P2 à base du peroxyde d'hydrogène l'hypochlorite de sodium (65%) alors que le produit P3 à base d'hypochlorite de sodium, vient en fin, en terme d'efficacité (56%).

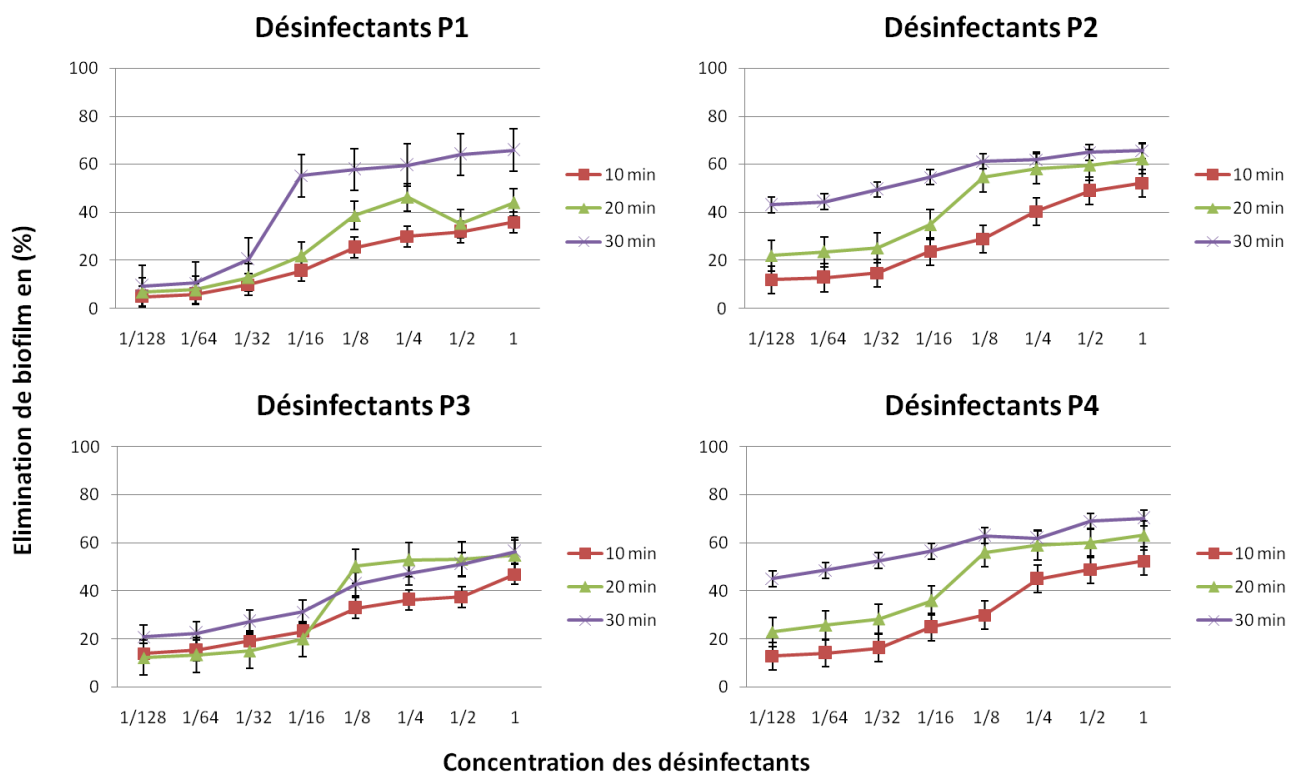


Figure 23 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur le polystyrène en fonction de la concentration pour les 4 produits testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.2.7. Potentiel anti-biofilm contre *S. warneri* K9

La plus grande efficacité anti-biofilm, est marquée pour le désinfectant P4 qui permet d'éliminer jusqu'à 50% de biofilm de *S. warneri* K9 développé sur le polystyrène après 10 min de traitement ce taux augmente en augmentant la concentration et en allongeant le temps de traitement jusqu'à 80% avec la solution mère du produit (figure 24). Alors que le produit P2 permet l'élimination de 30% de biofilm après 10 min de traitement avec la plus faible concentration, en notant que, ce taux accroît avec la concentration jusqu'à 80% avec la solution mère du produit après 30 min de traitement. D'ailleurs l'efficacité du produit P4 et P2 se rapproche en terme d'activité suivi par le produit P1 qui présente aussi un effet anti-biofilm, aussi intéressant, puisqu'il permet d'éliminer jusqu'à 75% de biofilm après 30 min de traitement avec la solution mère du produit. Tandis que, le produit P3 vient en dernier lieu en termes d'activité, leur effet augmente en augmentant la concentration en produit. En notant,

que le prolongement du temps de traitement progresse l'activité anti-biofilm des produits testés contre le biofilm *S. warneri* K9, développé sur le polystyrène (figure 24).

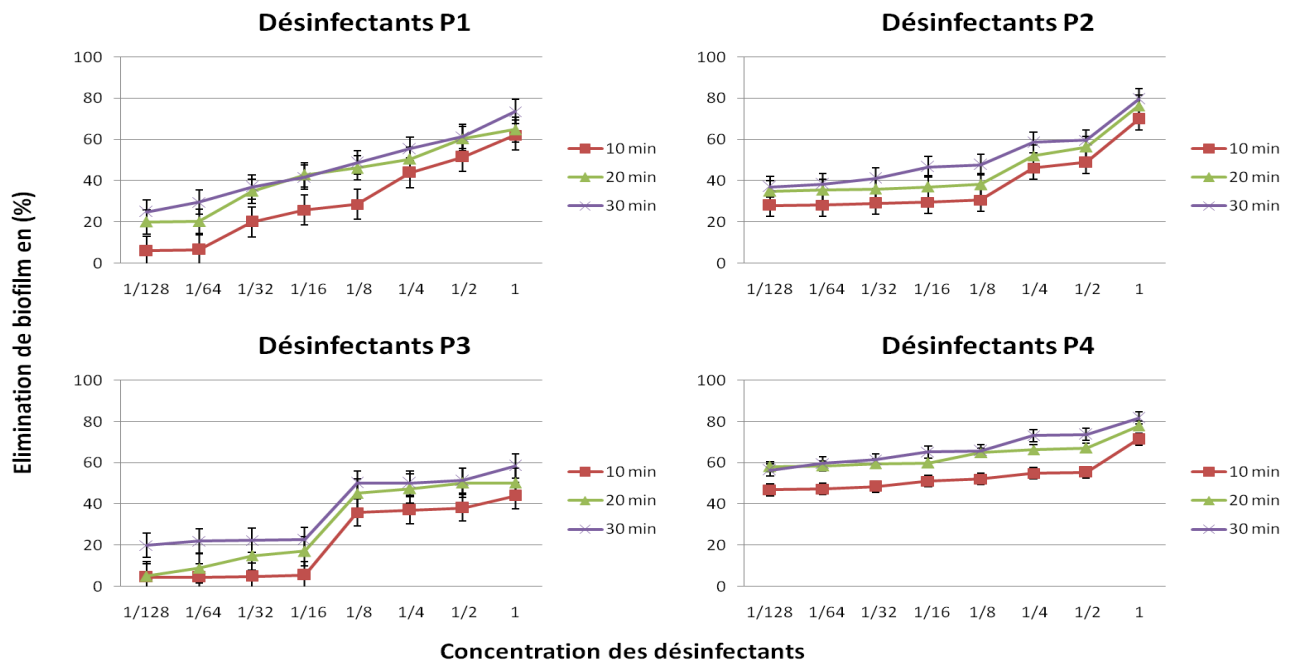


Figure 24 : Pourcentage d'élimination du biofilm de *S. warneri* K9 développé sur le polystyrène en fonction de la concentration pour les 4 produits testés après 10, 20, et 30 min de traitement. Chaque produit est présenté individuellement. Avec : Désinfectant (P1) (principe actif : alcool), désinfectant (P2) (principe actif : peroxyde d'hydrogène), désinfectant (P3) (principe actif : hypochlorite de sodium) et le désinfectant (P4) (3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

2.3. La résistance des biofilms bactériens aux désinfectants : discussion générale

Les désinfectants sont des agents chimiques utilisés sur des objets inanimés pour inactiver les microorganismes pathogènes pratiquement tous reconnus (Centers for Disease Control and Prevention, USA). Contrairement aux antibiotiques, qui sont des médicaments chimiothérapeutiques, principalement utilisés in vivo, pour contrôler les infections et qui interagissent avec des structures spécifiques, ou sur des processus métaboliques dans les cellules microbiennes, les désinfectants agissent, non spécifiquement, contre des cibles multiples (Meyer et Cookson, 2010).

Le mode d'action des désinfectants dépend du type de biocide utilisé, comme il a été largement décrit dans de nombreuses revues (McDonnell et Russell, 1999 ; Russell, 2003a et b). Les cibles potentielles, chez les bactéries Gram-positives ou Gram-négatives, sont la paroi

cellulaire ou la membrane externe, la membrane cytoplasmique, les protéines fonctionnelles et structurelles, l'ADN, l'ARN et d'autres composants cytosoliques. Les traitements de désinfection sont utilisés, dans des environnements médicaux, industriels et domestiques pour contrôler la biocontamination des surfaces. Bien que ces traitements biocides éliminent la majorité de la contamination de surface, certains microorganismes peuvent survivre et donner lieu à d'importants problèmes en termes de santé publique. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence la survie des microorganismes, après le nettoyage et la désinfection dans les aliments (Bagge-Ravn et al, 2003 ; Weese et al, 2006 ; Stock et al, 2007), dans le secteur médical (Deva et al, 1998 ; Martin et al, 2008) et dans des environnements domestiques (Cooper et al, 2008).

La résistance des microorganismes à la désinfection est souvent associée, à la présence de biofilms, sur des surfaces (Bressler et al, 2009 ; Vestby et al, 2009). Dans la plupart des environnements humides, les microorganismes sont capables d'adhérer à une surface, et de produire une matrice des EPS composée principalement d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Costerton et al, 1995 ; Branda et al, 2005 ; Hoiby et al, 2010). Les cellules noyées dans la matrice du biofilm sont capables d'exprimer des phénotypes qui diffèrent de ceux de leurs homologues planctoniques, comme nous l'avons donc montré au cours de notre étude, que la sensibilité des bactéries testées à la bactéricidie, de certains produits désinfectants, à l'état planctonique, n'a pas inhibée la synthèse de biofilm qui constitue pour elle une méthode d'échappement et de défense aux conditions hostiles (la bactéricidie des désinfectants), et d'afficher les propriétés spécifiques, y compris une résistance accrue aux traitements biocides, ce qui concorde parfaitement avec les résultats des études antérieures (Nett et al, 2008 ; Smith et Hunter 2008 ; Wong et al, 2010).

La définition de la «résistance» doit être clarifiée car elle change, selon que, les cellules soient planctoniques ou en biofilm. Dans le premier cas, une souche bactérienne est définie comme étant résistante à un biocide, si elle n'a pas été inactivée par une concentration ou une période d'exposition spécifique qui inactive habituellement la plupart des autres souches comme on a démontré dans notre travail par l'étude de la CMI et la CMB (Langsrud et al, 2003). Alors que les cellules en biofilm, à l'inverse, sont généralement dites résistantes en comparaison avec leurs homologues planctoniques. La résistance bactérienne aux biocides peut être intrinsèque, génétiquement acquise ou phénotypique (tolérance) (Langsrud et al, 2003 ; Russell, 2003 a et b). L'insensibilité «Biofilm» est parfois considérée comme une tolérance plutôt qu'une véritable «résistance» car elle est principalement induite par une adaptation physiologique au

mode de vie (croissance sessiles, des contraintes de nutriments, le contact avec des concentrations répétées sub-létaux de désinfectant) ; ainsi le biofilm peut être perdu ou nettement réduit lorsque les cellules de biofilm reviennent à l'état planctonique (Russell, 1999). Néanmoins, des variants résistants, stables, peuvent apparaître dans les biofilms. Par conséquent, tout au long de cet examen, le terme général de «résistance du biofilm» sera utilisé pour désigner l'insensibilité de biofilm, par rapport à l'état planctonique.

Une meilleure compréhension, des mécanismes impliqués dans la résistance du biofilm, aux biocides, joue une préoccupation majeure, chez les microbiologistes. Alors que, de nombreux documents ont porté sur les mécanismes de résistance du biofilm, aux antibiotiques (Stewart et Costerton, 2001 ; Stewart, 2002 ; Fux et al, 2005 ; Hoiby et al, 2010), il n'y a pas de commentaires récents qui traitent, spécifiquement, les mécanismes de résistance du biofilm aux désinfectants. Dans ce contexte, le présent paragraphe vise, d'abord, à examiner les différents facteurs liés aux caractéristiques physiologiques et structurelles, d'un biofilm, qui influencent sa résistance aux désinfectants.

2.3.1 Limitations de diffusion / de réaction de désinfectants dans les biofilms

La formation et le maintien des biofilms matures sont intimement liés à la production d'une matrice extracellulaire (Branda et al, 2005 ; Ma et al, 2009). Les multiples couches de cellules et d'EPS peuvent constituer une structure complexe et compacte dans laquelle les biocides peuvent difficilement pénétrer et atteindre les couches internes, entravant ainsi leur efficacité. A titre d'exemple, il a été montré, que les niveaux de chlore mesurés à l'intérieur de biofilms mixtes de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* en utilisant une microélectrode atteignent seulement 20% des concentrations mesurées dans le liquide en vrac (De Beer et al, 1994). De même, Jang et al. (2006) ont montré que le chlore à 25 mg.l⁻¹ ne pénètre pas au-delà d'une profondeur de 100 mm dans un biofilm laitier complexe qui était de 150 à 200 mm d'épaisseur. La diffusion restreinte de molécules dans la gamme de 3 à 900 kDa dans les biofilms en raison de l'exclusion de taille a déjà été signalé (Thurnheer et al, 2003). Mais comme les biocides sont souvent des molécules, chimiquement très réactives, la présence de matières organiques telles que les protéines, les acides nucléiques ou les hydrates de carbone et peuvent, profondément, altérer leur efficacité (Lambert et Johnston, 2001) et les interactions potentielles entre les antimicrobiens et les composants du biofilm, semble plus susceptible d'expliquer les limites de leur pénétration dans le biofilm. Ce qui est le cas des quatre produits désinfectants analysés dans notre étude (le désinfectant P1, à base d'alcool, le

désinfectant P2, à base du peroxyde d'hydrogène, le désinfectant P3, à base d'hypochlorite de sodium et le désinfectant P4, à base de 3 principes actifs : l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide).

En effet, des données intéressantes ont été produites en mesurant le temps de pénétration moyen dans un biofilm mixte de 1 mm d'épaisseur de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*, qui est huit fois plus élevé pour l'hypochlorite alcaline (48 min) que pour le chlorosulfamate (6 min), même si celui-ci a un poids moléculaire plus élevé (Stewart et al, 2001). La diminution de la pénétration du biocide alcalin a permis d'émettre l'hypothèse qu'il est lié à sa plus grande capacité de réagir avec les constituants de la matrice. Il a également été rapporté que la pénétration retardée du chlore, du glutaraldéhyde et 2, 2-dibromo-3-nitrilopropionamide dans un modèle de biofilm artificiel (*P. aeruginosa* piégé dans des billes de gel d'alginate) est due à des interactions entre les biocides et les composants dans les billes de gel (Grobe et al, 2002). En outre, les molécules biocides peuvent simplement adsorber les cellules et les composants de la matrice dans les biofilms. En utilisant la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), les capacités de diffusion des sondes fluorescentes (billes de latex et de dextran isothiocyanate- fluorescéine) avec différentes tailles et charges électriques ont été mesurées dans les biofilms avec des composants variables d'EPS (Gulot et al, 2002). Ces auteurs ont montré qu'en absence de toute interaction électrostatique, la majorité des particules testées peut pénétrer et diffuser dans un biofilm, ce qui suggère, que rien n'empêche la diffusion des agents antimicrobiens, en fonction de leur taille, à partir d'un point de vue stérique. Inversement, la diffusion de particules chargées positivement au sein de biofilms chargés négativement, a été entravée, en raison des interactions électrostatiques, comme cela a également été proposé, pour le chlorure cationique de cétylpyridinium (Ganeshnarayan et al, 2009).

Au cours des dix dernières années, l'émergence de techniques de microscopie optique innovantes telles que la microscopie confocale, à balayage laser (CLSM), et des améliorations dans le marquage fluorescent, ont fourni une opportunité pour l'enquête directe de la réactivité de biocide au sein de la structure native des biofilms (Bridier et al, 2011b). Une technique de microscopie confocale time-lapse directe a été développée pour permettre la visualisation en temps réel, de l'activité biocide dans un biofilm (Stoodley et al, 2001 ; Hope et Wilson, 2004 ; Takenaka et al, 2008 ; Davison et al, 2010 ; Bridier et al, 2011a). Cela peut fournir des informations, sur la dynamique d'action du biocide dans le biofilm et l'hétérogénéité spatiale de bactéries liées qui sont cruciales pour une meilleure compréhension des mécanismes de

résistance du biofilm. Expérimentalement, après coloration avec des marqueurs fluorescents, pour permettre la surveillance, en temps réel, de l'inactivation des cellules, la structure tridimensionnelle du biofilm est balayée par CLSM à intervalles réguliers au cours de l'exposition au biocide et ensuite les configurations spatiales et temporelles de l'action biocide sont visualisées dans la structure. Cette méthode a permis la démonstration que la pénétration de la QAC (composé d'ammonium quaternaire) au centre d'un biofilm de *S. epidermidis* a duré 60 fois plus longtemps que le temps estimé, pour l'accès de diffusion en absence de la sorption (Davison et al, 2010). Dans les biofilms de *P. aeruginosa*, différents modèles de la perte de fluorescence, ont été observées, selon le biocide utilisé: l'acide peracétique cause une perte uniforme et une perte linéaire de la viabilité des cellules, ce qui démontre que la plus grande résistance des cellules de biofilm ne pouvait pas être dû aux limites de pénétration (Bridier et al, 2011a). En revanche, la même étude a montré que le chlorure de benzalkonium est inactivé d'abord par les cellules situées dans les couches périphériques du biofilm. La charge positive et la nature hydrophobe du biocide pourraient donc expliquer la pénétration retardée observée. Dans un biofilm de *P. aeruginosa*, le niveau de résistance bactérienne au chlorure de benzalkonium augmente avec la longueur de la chaîne C, du composé d'ammonium quaternaire (QAC de C12 à C18) (Campanac et al, 2002). Cette augmentation de la longueur de chaîne C, conduisant à une augmentation du caractère hydrophobe de la molécule, qui a permis de formuler l'hypothèse que sa pénétration à travers la matrice hydrophile est limitée ce qui entraîne une perte progressive d'efficacité bactéricide à l'intérieur du biofilm. Plus récemment, le rôle de la longueur de la chaîne C, dans la liaison de composants QAC au biofilm, probablement par des interactions hydrophobes, a également été proposé (Sandt et al, 2007). Dans une autre étude récente, il a été signalé que l'hydrophobie bactérienne de la paroi cellulaire pourrait modifier la diffusion de nanoparticules dans un biofilm (Habimana et al, 2011). Ce qui suggère que les composants de la paroi tels que le peptidoglycane, le fimbriae, les capsules et la couche S, peuvent aussi affecter la diffusion de composés dans le biofilm.

En outre, d'autres composants, tels que des enzymes, sont présents dans la matrice extracellulaire et peuvent jouer un rôle dans la neutralisation de composés toxiques. Par exemple, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène est en mesure de pénétrer et de tuer des cellules en partie seulement dans un biofilm formé par *P. aeruginosa* à catalase déficiente (Stewart et al, 2000). Dans un biofilm de type sauvage, les bactéries ont été protégées contre la pénétration de H₂O₂ par sa destruction médiée par la catalase. Ceci est concordant avec notre

étude sur *P. aeruginosa* P59, puisqu'on a trouvé que le produit P2 à base de H₂O₂ marque la plus faible efficacité anti-biofilm que les autres produits analysés.

L'ensemble de ces études explique les résultats obtenus, dans notre présente étude, puisqu'elles montrent, que les limitations de transport, peuvent être un mécanisme qui contribue à la résistance de biofilms aux désinfectants. Cela semble être lié principalement à des interactions physico-chimiques entre le biocide et les EPS ou les cellules bactériennes, plutôt que l'encombrement stérique, à l'intérieur du biofilm. Néanmoins, bien que les problèmes de diffusion / de réaction peuvent expliquer en partie la résistance de biofilms, certaines études ont montré que, malgré une pénétration efficace d'un biocide dans un biofilm, seul un faible niveau d'inactivation a été réalisé (Stewart et al, 2001). En outre, la résistance d'un biofilm de *S. aureus* à une QAC pourrait, dans une large mesure, être attribuée à des modifications phénotypiques dans les cellules plutôt que la présence d'un protecteur de matrice EPS (Campanac et al, 2002). Ces résultats mettent en évidence l'existence de mécanismes supplémentaires impliqués dans la résistance du biofilm, qui seront présentés, dans les sections suivantes.

2.3.2 Adaptations phénotypiques des cellules de biofilm à des concentrations sublétales de désinfectants

Au cours d'un processus de désinfection, la réaction de diffusion limitant la pénétration de biocides dans un biofilm peut se traduire par des niveaux faibles d'exposition à l'agent antimicrobien dans les régions les plus profondes du biofilm. Les cellules de biofilm ont donc développée des réponses adaptatives à des concentrations sublétales de désinfectant. L'augmentation de la survie qui suit le même choc par le QAC a été rapporté dans des souches *P. aeruginosa* adaptées, à côté des modifications concomitantes de la composition de la membrane (Jones et al, 1989 ; Méchin et al, 1999). L'adaptation dépend de l'agent désinfectant étant efficace en présence de QAC, contrairement à dichloroisocyanurate de sodium ou le phosphate trisodique (Guérin-Mechin et al, 1999). L'ensemble de ces études explique les résultats obtenus dans notre présente étude, puisqu'on a constaté que l'activité anti-adhésion reste toujours limitée par la résistance de la souche étudiée qui développe des réponses adaptatives à des concentrations sublétales de désinfectant. En effet, certaines concentrations activent la formation du biofilm en notant que plus on diminue la concentration en produit (à des concentrations sublétales de désinfectant) plus la formation du biofilm s'active et se stimule plus que la normale (c'est- à -dire en absence de désinfectant) pour

certaines souches comme *Salmonella* spp S3349, *S. aureus* K1 et *S. pyogènes* P4 sur leur support correspondant.

En outre, la résistance croisée aux autres QAC (Méchin et al, 1999) ou à des antibiotiques (Braoudaki et Hilton, 2004) a été signalé pour les cellules adaptées. L'adaptation des populations de cellules du biofilm aux désinfectants a été signalée pour la première fois chez *Salmonella* (Mangalappalli-Illathu et al, 2008) : les cellules en biofilm affichent une meilleure adaptation au chlorure de benzalkonium que leurs homologues planctoniques après une exposition continue. Dans ce cas, la régulation positive des protéines spécifiques impliquées dans le métabolisme de l'énergie, la biosynthèse des protéines, l'adaptation de la protéine (CspA) et la désintoxication (Mangalappalli-Illathu et Korber, 2006), avec un changement dans la composition en acides gras (Mangalappalli-Illathu et al, 2008) a suggéré que l'adaptation spécifique en biofilm confère une meilleure survie de la population de biofilm adapté. Ces résultats corroborent avec notre étude puisqu'on a constaté que *Salmonella* spp S3349 possède une résistance accrue, plus apparente que les autres souches étudiées, qui se manifeste par une activation de formation de biofilm, plus marquée qu'à l'état normale en absence de désinfectant, à partir des concentrations sublétales qui sont inférieures à celles de la CMI et la CMB. Cette activation peut être expliquée comme une méthode pour s'adapter et s'échapper à l'action bactéricide des désinfectants en formant ainsi le biofilm pour qu'elles puissent se protéger à l'intérieur d'une matrice solide qui ne donne pas l'accès aux agents antimicrobiens en conférant ainsi une meilleure survie de la population de biofilm adapté.

En outre, les conditions qui prévalent pendant l'adhérence initiale à un substrat peuvent jouer un rôle essentiel dans la résistance du biofilm à un désinfectant comme il est la première étape dans la construction de l'architecture du biofilm (Dynes et al, 2009). La morphologie cellulaire, la distribution spatiale et les quantités relatives d'EPS dans les biofilms de *Pseudomonas* se sont révélés différentes, en présence de doses sublétales de la chlorhexidine, le chlorure de benzalkonium ou le triclosan. Le dioxyde de chlore à des doses sublétales a également été démontré pour stimuler la formation de biofilms dans *Bacillus subtilis* (Shemesh et al, 2010). Ces auteurs ont démontré, que la transcription des principaux gènes responsables de la production de la matrice du biofilm, a été améliorée, en présence de chlore tout au long de l'activation de la kinase kinC liée à la membrane.

2.3.3 Adaptations phénotypiques des cellules à l'intérieur du biofilm

De l'attachement des cellules à l'élaboration d'une structure tridimensionnelle, la croissance d'un biofilm est associée à des adaptations physiologiques des cellules qui peuvent conduire à une augmentation de la résistance aux biocides. Ces adaptations phénotypiques résultent de l'expression de gènes spécifiques en réponse à des conditions micro-environnementales directes. Les comparaisons de profils d'expression génique, et les analyses protéomiques de l'état planctonique et l'état biofilm de différentes espèces, ont permis de soutenir cette idée (Prigent-Combaret et al, 1999 ; Whiteley et al, 2001 ; Sauer et al, 2004 ; Shemesh et al, 2007).

Par exemple, certaines études ont montré que juste après qu'une cellule atteint une surface, des gènes codant pour les protéines flagellaires sont réprimées et d'autres gènes codant pour les EPS et les protéines d'adhésion, telles que les curli, sont induites (Davies et al, 1993 ; Vidal et al, 1998 ; Prigent-Combaret et al, 2000 ; Sauer et Camper, 2001). Ces changements induits par l'adhésion cellulaire peuvent conduire à l'apparition de plusieurs phénotypes de résistances, comme nous avons montré dans notre étude et comme il a été suggéré par des études rapportant la plus grande résistance des cellules qui sont simplement collées sur une surface par rapport à leurs homologues planctoniques (Frank et Koffi, 1990 ; Chavant et al, 2004 ; Kamgang et al, 2007).

Après l'étape d'adhésion, les bactéries commencent à se développer dans un biofilm avec une structure tridimensionnelle. Une conséquence directe de la croissance de cette structure est l'apparition de gradients chimiques dans le biofilm. Les cellules situées à la périphérie de la communauté ont l'accès aux nutriments et à l'oxygène, tandis que les bactéries de biofilm dans les couches internes subissent des micro-environnements pauvres en éléments nutritifs, où les concentrations des produits de déchets métaboliques sont plus élevées. Cette hétérogénéité chimique régit l'apparition de l'hétérogénéité physiologique (Xu et al, 1998 ; Stewart et Franklin, 2008). Deux gènes de constructions de protéine fluorescente verte (GFP) ont été utilisés pour démontrer l'existence de motifs stratifiés de la croissance et la synthèse des protéines dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Werner et al, 2004). La synthèse des protéines et la croissance active de la cellule sont limitées à la zone où l'oxygène est disponible et représenté par une bande étroite en contact avec le milieu. Les cellules avec des taux métaboliques distinctifs étaient présentes tout au long de la structure tridimensionnelle, constituant ainsi une population physiologiquement hétérogène. L'altération des taux de croissance et d'activité induit des modifications de la composition membranaire et l'expression

des mécanismes de défense qui pourrait conduire à une augmentation de la résistance des bactéries aux biocides induits (Stewart et Olson, 1992 ; Lisle et al, 1998 ; Saby et al, 1999 ; Taylor et al, 2000 ; Sabev et al, 2006).

En effet, il est maintenant largement admis que le développement d'une réponse au stress est un élément important du cycle de vie des biofilms (Beloin et Ghigo, 2005 ; Coenye, 2010). Par exemple, il a été signalé chez *P. aeruginosa* que RpoS, qui est le principal régulateur d'une réponse générale au stress, était trois fois plus fortement exprimé dans les cellules de biofilm agé de trois jours que dans les cellules planctoniques stationnaires (Xu et al, 2001). Différents gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif ont également été montré d'être induites dans les biofilms de *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ou *Tannerella forsythia* (Sauer et al, 2002 ; Trémoulet et al, 2002 ; Ren et al, 2004 ; Pham et al, 2010) et peuvent offrir une protection pour les bactéries contre l'activité des agents oxydants.

En outre, la régulation positive ou l'induction de gènes codant pour des pompes à efflux multirésistantes dans les biofilms peuvent être un autre mécanisme possible pour expliquer la résistance bactérienne à un biocide, comme déjà indiqué pour les antibiotiques (Gillis et al, 2005 ; Kvist et al, 2008). Les pompes à efflux sont des systèmes qui permettent aux cellules de se débarrasser de molécules toxiques et permettre aux bactéries de survivre dans la présence de ces substances. Un exemple d'un système bien connu spécifique aux biocides est le système d'efflux QAC de *S. aureus* qui est responsable du haut niveau de résistance au QAC et biocides cationiques (Mitchell et al, 1998 ; Smith et al, 2008). Des systèmes similaires ont été identifiés chez autres espèces ainsi que pour d'autres biocides tels que le triclosan ou chlorhexidine (Poole, 2005 ; Villagra et al, 2008). Cependant, l'induction de pompes à efflux biocides dans les biofilms n'a pas encore été clairement démontrée et d'autres recherches sont nécessaires pour déterminer si ce phénomène joue un rôle important dans la résistance du biofilm.

L'apparition d'un phénotype biofilm-spécifique a été montrée pour être au moins en partie induite par le quorum sensing. En effet, la communication de cellule à cellule a été identifié comme le contrôle du développement du biofilm dans un certain nombre d'espèces bactériennes (Parsek et Greenberg, 2000 ; Huber et al, 2001 ; Cvitkovitch et al, 2003 ; Labbate et al, 2004 ; Waters et al, 2008). En outre, il a été observé qu'une signalisation lasI d'un mutant de *P. aeruginosa* a formé un biofilm avec une architecture plate par rapport au type sauvage, et affiche également la preuve de sa sensibilité accrue au SDS (Davies et al, 1998).

De même, les mutants lasI et RHLI de *P. aeruginosa* présentaient une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène et du méthosulfate phenazin (Hassett et al, 1999). En outre, ces auteurs ont montré que l'expression de gènes catalase et du superoxyde dismutase codant pour des enzymes de protection contre le stress « oxydant » étaient sous le contrôle du quorum sensing. Conformément à ces résultats, la régulation de la réponse au stress par le quorum sensing a plus récemment été rapporté dans d'autres espèces (Lumjiaktase et al, 2006 ; Joelsson et al, 2007 ; Pontes et al, 2008).

Une dernière illustration de l'adaptation des phénotypes spécifiques qui peuvent contribuer à la résistance bactérienne observée dans les biofilms est qu'une petite fraction de la population peut entrer dans un état de haute protection affichant une résistance dramatique et dénommé persistants (Harrison et al, 2005 ; Lewis, 2005). Ces cellules sont des variantes phénotypiques, mais pas des mutants génétiques, et elles ont également été identifiées dans des populations bactériennes planctoniques (Lewis, 2001 ; Shah et al, 2006). Une hypothèse est que les persistants se développent plus fréquemment dans un biofilm que dans une culture planctonique, peuvent être induites par les conditions environnementales spécifiques qui prévalent au sein de la structure, et peuvent donc contribuer à une meilleure protection antimicrobienne dans le biofilm (Stewart, 2002; Roberts et Stewart, 2005). Conformément à ces résultats, nos résultats rapportés sur sept espèces bactériennes viennent pour soutenir cette hypothèse.

2.3.4 Gènes de transferts et de mutations

Le transfert latéral de gènes participe à l'adaptation microbienne à l'environnement à travers l'échange de séquences génétiques, y compris des plasmides, des transposons ou d'intégrons qui confèrent des caractères phénotypiques spécifiques aux cellules, telles que leurs capacités métaboliques, l'expression de la virulence et de la résistance aux antimicrobiens (Top et Springael, 2003 ; Kelly et al, 2009 ; Hannan et al, 2010). Par exemple, les gènes de résistance au QAC portés par des éléments génétiques transférables ont été largement identifiés (Bjorland et al, 2001 ; Gillings et al, 2009 ; Elhanafi et al, 2010). Différentes études ont généré des preuves suggérant que les biofilms peuvent constituer un environnement optimal pour l'échange de matériel génétique (Hausner et Wuertz, 1999 ; Maeda et al, 2006 ; Ando et al, 2009 ; Nguyen et al, 2010), conduisant à la diffusion des cassettes de résistance au biocide au sein de la population. En effet, la haute densité cellulaire, la présence d'une matrice, la libération de grandes quantités d'ADN ou des conditions de nutriments à l'intérieur de

biofilms peuvent favoriser les processus de conjugaison et de transformation. Une autre considération est que la croissance du biofilm peut conduire à l'émergence d'une vaste diversité génétique au sein d'une population bactérienne. Driffield et al. (2008) ont montré que les cellules dans un biofilm de *P. aeruginosa* affichent une augmentation de jusqu'à 105 fois de la mutabilité par rapport à une culture planctonique. Il a été observé que des mutations de *P. aeruginosa* surviennent principalement dans des microcolonies mais pas ailleurs dans un biofilm ou dans des cultures planctoniques, montrant que ces zones denses de biofilm pourraient, en effet, favoriser des mutations (Conibear et al, 2009). Différentes études ont signalé l'apparition de variantes génétiques dans les biofilms qui affichent des traits phénotypiques distinctifs (Boles et al, 2004 ; Kirisits et al, 2005 ; Allegrucci et Sauer, 2007). La production des variantes peut conduire à l'apparition des sous-populations les plus résistantes qui permettront d'améliorer l'aptitude de l'ensemble de la population dans des conditions stressantes. Par exemple, lorsque *P. aeruginosa* a été cultivé dans un biofilm pendant cinq jours, trois différentes morphologies de colonies stables, appelées typiques (colonies de type sauvage), mini (des variantes colonies petites) et ridées (des variantes colonies rugueuses), apparues après leur placage sur boîte de Pétri, tandis que l'inoculum initial (bouillon de culture) a produit seulement une morphologie de colonie (typique) (Boles et al, 2004). Par l'utilisation du CLSM, ces auteurs ont montré que la variante ridée présente une plus grande aptitude à former un biofilm et avec de plus grands agrégats de cellules par rapport à la souche de type sauvage. De plus, la présence d'une sous-population ridée était responsable de la meilleure résistance du biofilm au peroxyde d'hydrogène parce que cette population constitue > 98% des cellules de biofilm après l'exposition au biocide, alors qu'elle avait atteint seulement 12% avant le traitement. En outre, les auteurs ont montré qu'un biofilm composé uniquement des souches de type sauvage (des colonies typiques) a démontré un haut niveau de sensibilité au biocide. Ces résultats révèlent donc comment les mutations génétiques induites par la formation de biofilm peuvent conduire à une meilleure résistance à un biocide. La question qui reste néanmoins, après ces observations concerne les mécanismes impliqués dans la production de variantes génétiques au sein d'un biofilm. Les mutations spontanées liées à la réplication des erreurs sont une explication naturelle. Cependant, il a été constaté que le stress oxydatif endogène provoque des cassures d'ADN double brin qui ont provoqué l'émergence de variantes lorsque ces pauses ont été réparées par des gènes de réparation d'ADN de recombinaison (Boles et Singh, 2008). Dans une étude précédente, Ciofu et al. (2005) ont également déclaré que la présence de *P. aeruginosa* hypermutable était liée au stress oxydatif dans l'infection de la fibrose kystique. En outre, la production endogène

d'intermédiaires réactifs de l'oxygène, à l'intérieur des microcolonies du biofilm, a déjà été rapportée (Mai-Prochnow et al, 2008). L'ensemble de ces observations suggèrent que le stress oxydatif induit dans un biofilm, par un microenvironnement sévère, peut provoquer l'apparition de variants résistants, aux biocides par l'amélioration de mutations génétiques.

2.4. Conclusion

Parce que les biofilms constituent un moyen privilégié de la vie pour les bactéries, une meilleure compréhension des processus impliqués dans leur résistance marquée aux désinfectants est d'une importance cruciale pour leur contrôle. D'après nos études examinées dans le présent document, il est maintenant évident que la résistance de biofilm au désinfectant est: (i) intimement liée à la structure tridimensionnelle du biofilm, (ii) l'hétérogénéité au sein de la biostructure et (iii) la multifactorielle résultant d'une accumulation de mécanismes différents. Compte tenu de la résistance observée des biofilms aux désinfectants, il est maintenant crucial que les normes réglementaires qui se concentrent sur l'évaluation de l'efficacité d'un désinfectant doivent tenir compte du mode de vie des biofilms.

Chapitre V : Potentiel antimicrobien des enzymes

D'après nos études examinées dans le présent document, il est clair que la résistance du biofilm aux désinfectants est un processus multifactoriel résultant de différents mécanismes et provoquant l'inefficacité des antimicrobiens, même à des concentrations utilisables dans des solutions commerciales (Krolasik et al, 2010). De nouvelles stratégies de contrôle sont nécessaires pour surmonter ces limitations. Une autre considération est que les normes réglementaires sont entrain de changer et certains désinfectants qui sont aujourd'hui standard seront probablement interdits pendant les prochaines années (Reach, la directive européenne sur les biocides, 98/8/CE). Il devient donc crucial de trouver des molécules alternatives dites «vertes» ou des procédés qui sont efficaces dans l'élimination de la contamination de surface. La prochaine partie de cette étude met en évidence certaines méthodes potentielles susceptibles d'améliorer les stratégies anti-adhésion et anti-biofilm.

La limitation de la diffusion / réaction à l'intérieur d'une structure de biofilm est l'un des principaux mécanismes impliqués dans la résistance aux désinfectants. L'optimisation de l'éradication ou de la dégradation de la matrice sera donc essentielle à l'amélioration du processus de désinfection. Il est bien connu que l'action mécanique peut être efficace dans l'élimination des biofilms (Maukonen et al, 2003) en perturbant l'EPS dans la matrice de microorganismes et en le rendant plus accessible. Dans ce contexte, l'utilisation de produits à base d'enzymes pourrait être un outil utile pour améliorer le processus de nettoyage. Cependant, il est d'abord nécessaire d'élucider la composition précise de la matrice de biofilm de sorte que les traitements enzymatiques appropriés peuvent être appliqués. En règle générale, une matrice de biofilm est principalement composée de polysaccharides et de protéines (Tsuneda et al, 2003) associés à des lipides ou des acides nucléiques (Flemming et Wingender, 2010), mais sa composition peut afficher des variations qualitatives et quantitatives selon les souches et les conditions de croissances impliquées (Branda et al, 2005). En effet, les procédés enzymatiques ont l'avantage de désagréger les amas de biofilm plutôt que de les retirer simplement de la surface, comme cela est le cas avec une action mécanique. Une façon possible d'utiliser des procédés enzymatiques pourrait promouvoir une dégradation naturelle de la matrice du biofilm.

Nous avons choisi d'étudier l'effet de préparations enzymatiques commerciales sur le biofilm. Leur utilisation en prévention comme en lavage permettrait d'éliminer les molécules organiques impliquées dans la formation, la cohésion et le développement des biofilms

comme le film primaire présent dans les premières étapes de l'adhésion, les molécules membranaires de type adhésines, les EPS de la matrice extracellulaire ou les molécules signal du quorum sensing (QS). Nous avons choisi de nous tourner vers l'utilisation d'enzymes commerciales qui présentent l'intérêt d'être déjà caractérisées et produites en quantité industrielles.

Les caractéristiques des différentes préparations enzymatiques commerciales que nous avons choisies d'utiliser sont répertoriées dans le Tableau 5 du chapitre 2 paragraphe 1.2. Les enzymes sélectionnées font partie de la famille des hydrolases et sont spécifiques de protéines et polysaccharides (Allison, 2003), molécules organiques composant les EPS au sein de biofilms divers (chapitre 1 paragraphe 1.1.3). Nous avons donc sélectionné des protéases et des glycosidases.

Bien que la nature de la composition des EPS soit connue, aucun des composés organiques n'a encore été caractérisé au niveau de leur séquence en acide aminé concernant les protéines ou leur séquence osidique concernant les polysaccharides. Les enzymes ont donc été choisies principalement en fonction de leur large spectre d'activité. Concernant les protéases, nous avons sélectionné différentes sous classes d'enzymes au spectre d'activité large. En plus, nous avons choisi une large gamme de diverses activités glycosidases représentatives de la nature des monosaccharides et des liaisons les plus rencontrées.

En plus de ces critères de sélection, nous avons aussi pris en compte les différentes études bibliographiques sur les traitements enzymatiques déjà publiés concernant les biofilms en milieux industriels, environnementaux et médicaux et ceux associés à des bactéries pathogènes (chapitre 1 paragraphe 3.2.2.). Le choix s'est également orienté sur des préparations enzymatiques commerciales disponibles pour les expérimentations.

Ainsi, nous allons tester le potentiel anti-adhésion et anti-biofilm de quatre protéases et quatre glycosidases sur des modèles d'adhésion bactérienne sur des supports différents introduits en microplaque mis au point précédemment en présentant les trois secteurs : industriel, environnemental et médical.

1. Activité enzymatique contre des bactéries planctoniques

1.1. Concentration minimale inhibitrice CMI

Nous avons testé l'activité inhibitrice de quatre protéases et quatre glycosidases, à différentes concentrations, contre sept bactéries pathogènes à l'état planctonique. Cette phase est indispensable à la mise en évidence éventuelle d'un effet spécifique préventif (anti-adhésion) et curatif (anti-biofilm) des biofilms à une concentration infra-inhibitrice de croissance. Les résultats de l'activité antibactérienne de ces différents composés sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Seuil d'efficacité (Concentration Minimale Inhibitrice) de quatre protéases et quatre glycosidases sélectionnées contre sept bactéries pathogènes.

		Concentration minimal inhibitrice CMI pour chaque bactérie testée (%)						
		<i>P. aeruginosa</i> P59	<i>Salmonella</i> spp S3349	<i>E. coli</i> E1523	<i>S. warneri</i> K9	<i>S. sciuri</i> K17	<i>S. aureus</i> K1	<i>S. pyogène</i> s P4
Protéases	Subtilisine A	6 U.ml ⁻¹	2 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹	4 U.ml ⁻¹	4 U.ml ⁻¹
	Trypsine	8 U.ml ⁻¹	4 U.ml ⁻¹	8 U.ml ⁻¹	4 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹
	Pepsine	200 U.ml ⁻¹	200 U.ml ⁻¹	200 U.ml ⁻¹	200 U.ml ⁻¹	200 U.ml ⁻¹	150 U.ml ⁻¹	150 U.ml ⁻¹
	papaine	2 U.ml ⁻¹	1 U.ml ⁻¹	3 U.ml ⁻¹	2 U.ml ⁻¹	4 U.ml ⁻¹	2 U.ml ⁻¹	2 U.ml ⁻¹
Glycosidases	Xylanase	6 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹	4 U.ml ⁻¹	2 U.ml ⁻¹	4 U.ml ⁻¹	6 U.ml ⁻¹	2 U.ml ⁻¹
	β-glucanase	0.4 U.ml ⁻¹	0.3 U.ml ⁻¹	0.4 U.ml ⁻¹	0.3 U.ml ⁻¹	0.3 U.ml ⁻¹	0.4 U.ml ⁻¹	0.3 U.ml ⁻¹
	Pectinase	1/2	1/8	1/2	1/8	1/4	1/2	1/4
	Cellulase	0.4 U.ml ⁻¹	0.2 U.ml ⁻¹	0.2 U.ml ⁻¹	0.3 U.ml ⁻¹	0.3 U.ml ⁻¹	0.3 U.ml ⁻¹	0.2 U.ml ⁻¹

D'après ces résultats, chaque enzyme testée possède une action spécifique qui varie selon les microorganismes. A noter que le produit cellulase présente les plus faibles valeurs de CMI, d'où sa grande efficacité sur les bactéries en suspension. Les résultats des CMI montrent évidemment que les sept souches sont sensibles aux enzymes testées. À titre de comparaison, on constate que *salmonella* spp S3349 est la souche la plus sensible aux huit enzymes analysées alors que *P. aeruginosa* P59 enregistre des CMI les plus élevées que les autres souches d'où sa faible sensibilité.

1.2. Concentration minimale bactéricide CMB

Nous avons testé l'activité bactéricide des quatre protéases et quatre glycosidases, à des concentrations supérieures ou égales de celles de la CMI, contre les sept bactéries pathogènes

à l'état planctonique. Cette phase est indispensable, en complétant les résultats de la CMI nécessaires, pour la mise en évidence éventuelle d'un effet spécifique préventif (anti-adhésion) et curatif (anti-biofilm) des biofilms par ces enzymes.

Les résultats ont montré que les enzymes étudiées n'ont pas enregistré une activité bactéricide contre les sept bactéries pathogènes à l'état planctonique pour les concentrations utilisées.

2. Activité enzymatique contre des bactéries en biofilm

Les préparations enzymatiques ont été testées au moins trois fois sur trois microplaques différentes.

2.1. Protéases

De la même manière que pour les produits désinfectants (chapitre IV, paragraphe 2), l'effet des protéases a été testé sur les biofilm de sept souches bactériennes développés sur les supports correspondants (verre, inox, cathéter, polystyrène et tuyau de polyéthylène) introduits en microplaque, selon les protocoles de prévention (enzyme incubée en même temps avec la solution bactérienne) et de lavage (enzyme incubée 10, 20 et 30 min sur un biofilm préformé). Les résultats comportant tous les points expérimentaux sont présentés en donnant les pourcentages d'élimination et d'inhibition de formation de biofilm en fonction de la concentration en unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U.ml^{-1}$) des quatre protéases testées. Sachant que la pepsine est concentrée 50 fois plus que la papaïne et 25 fois plus que la subtilisine et la trypsine, et que la papaïne est 2 fois moins concentrée que la subtilisine et la trypsine.

2.1.1 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *P. aeruginosa* P59

On observe que la subtilisine semble la plus intéressante. En effet, pour le protocole de prévention une courbe d'inhibition exponentielle est enregistrée avec un maximum proche des 70% d'inhibition (figure 25). Alors que, pour le protocole de lavage un plateau d'efficacité maximum proche des 65% d'élimination est rapidement atteint en notant que l'allongement du temps de traitement n'a pas une grande influence sur l'effet anti-biofilm. De plus les valeurs obtenues sont très reproductibles. Il en est de même pour la trypsine concernant la prévention et le lavage d'un biofilm, utilisé à des mêmes concentrations que la subtilisine, en enregistrant un effet anti-adhésion inférieures à celui de la subtilisine avec un maximum d'effet de 65%. Par ailleurs, la papaïne (utilisée à des concentrations en $U.ml^{-1}$ inférieur que pour la subtilisine et la trypsine) présente une inhibition moyenne en prévention sur un

biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur le polyéthylène avec un effet qui augmente avec la concentration de cet enzyme jusqu'à atteindre un maximum de 55% d'inhibition. Tandis que, en lavage un plateau d'élimination maximum proche des 62% est rapidement atteint en notant que l'allongement du temps de traitement améliore l'effet anti-biofilm de cet enzyme.

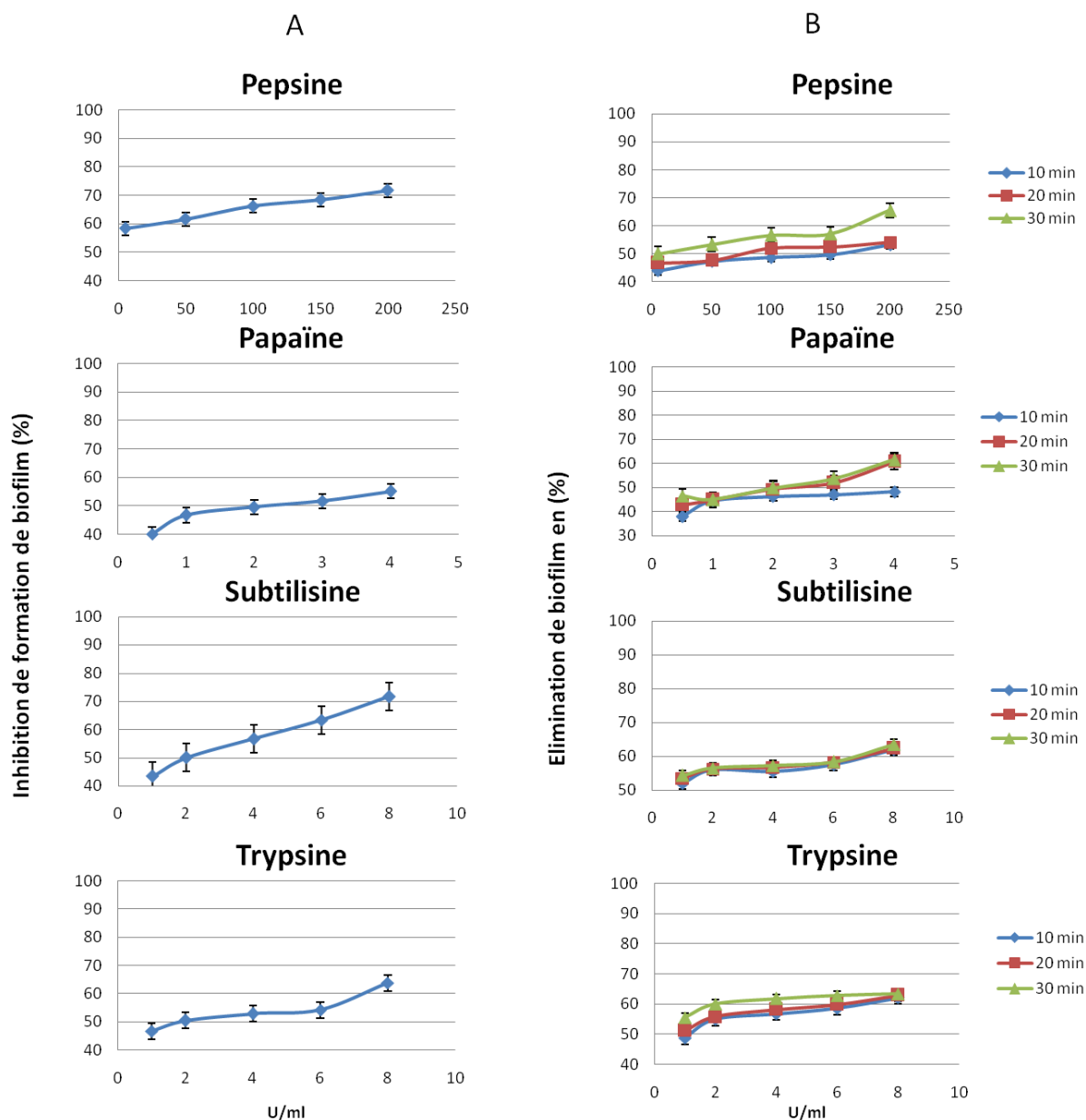


Figure 25 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur des coupons de tuyau de polyéthylène introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Alors que, la pepsine a été utilisée à des concentrations presque 50 fois plus élevées que les autres protéases étudiées. En effet, pour le protocole de prévention, un plateau d'inhibition maximum proche des 72% d'élimination est rapidement atteint. Son effet en prévention est marqué plus qu'en lavage en notant que l'allongement du temps de traitement améliore l'effet anti-biofilm de 55% après 10 min de traitement à 65% après 30 min de traitement notée pour la plus forte concentration testée pour cette enzyme (200 U/ml).

2.1.2 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *E. coli* E1523

On remarque que les quatre protéases analysées exercent un effet anti-biofilm plus important qu'un effet anti-adhésion, qui augmentent avec la concentration en enzyme (pour les deux tests) et en prolongeant le temps de traitement (pour le protocole de lavage) avec un optimum d'efficacité enregistré après 20 min de traitement (figure 26). En enregistrant un maximum d'efficacité anti-adhésion qui varie entre 28 et 55% plus marqué pour la trypsine, la pepsine, la subtilisine, suivie par la papaïne, et un maximum d'efficacité anti-biofilm qui varie entre 67 et 73% plus marqué pour la subtilisine suivie par la trypsine, la pepsine et la papaïne (sachant que la pepsine est concentrée 50 fois plus que la papaïne et 25 fois plus que la subtilisine et la trypsine, et que la papaïne est 2 fois moins concentrée que la subtilisine et la trypsine).

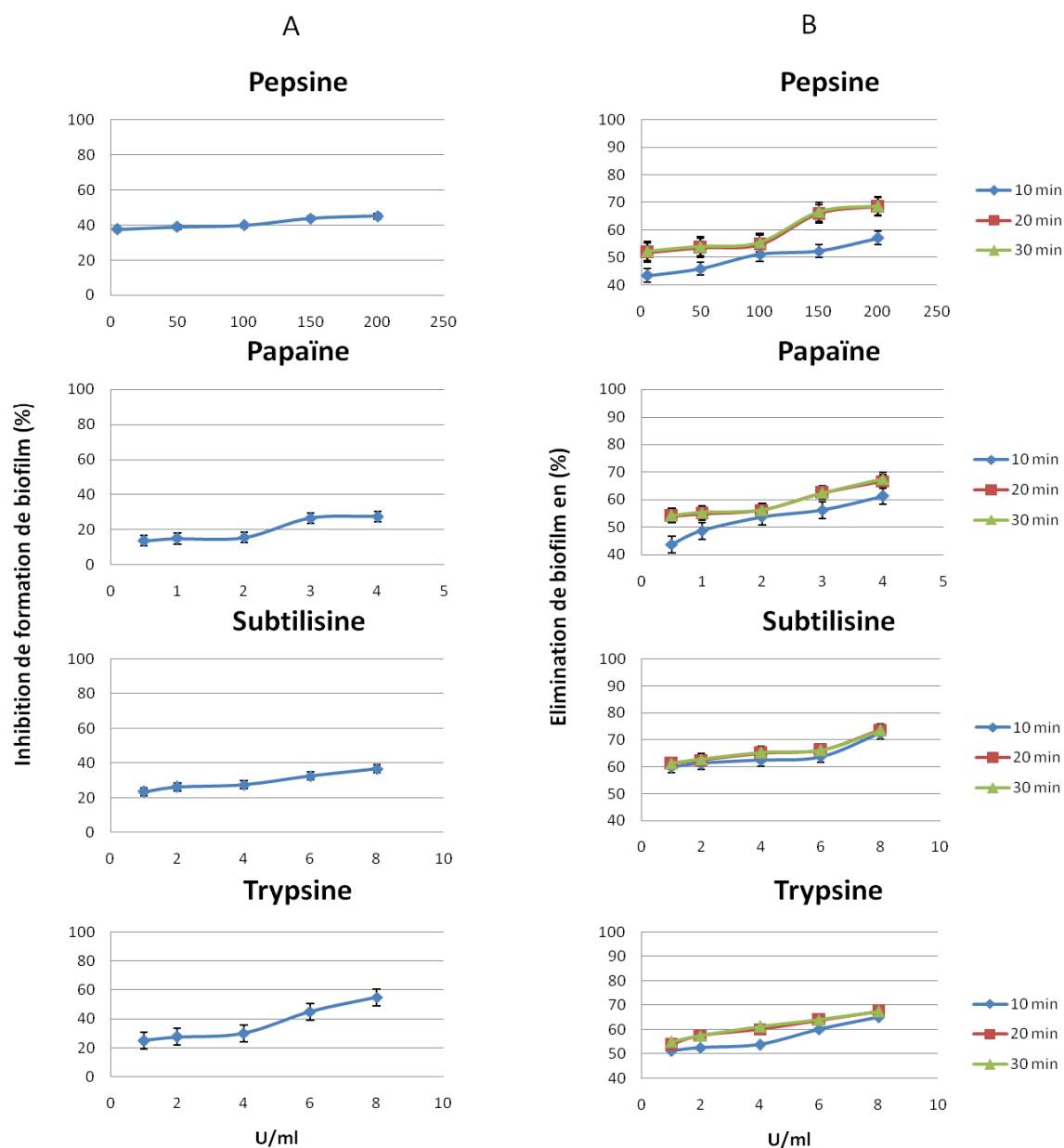


Figure 26 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *E. coli* E1523 développé sur des billes de verre introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

2.1.3 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *Salmonella* spp S3349

On constate, que les valeurs obtenues, sont très reproductibles entre les deux protocoles (figure 27). En effet, les quatre protéases, testées, exercent un effet anti-adhésion similaire à l'effet anti-biofilm, mais seulement après 20 min de traitement pour la pepsine et la papaïne. En plus, la diminution du temps de traitement à 10 min diminue l'efficacité anti-biofilm de

ces deux enzymes, alors que la subtilisine et la trypsine ne sont pas influencées pas par l'action du temps de traitement.

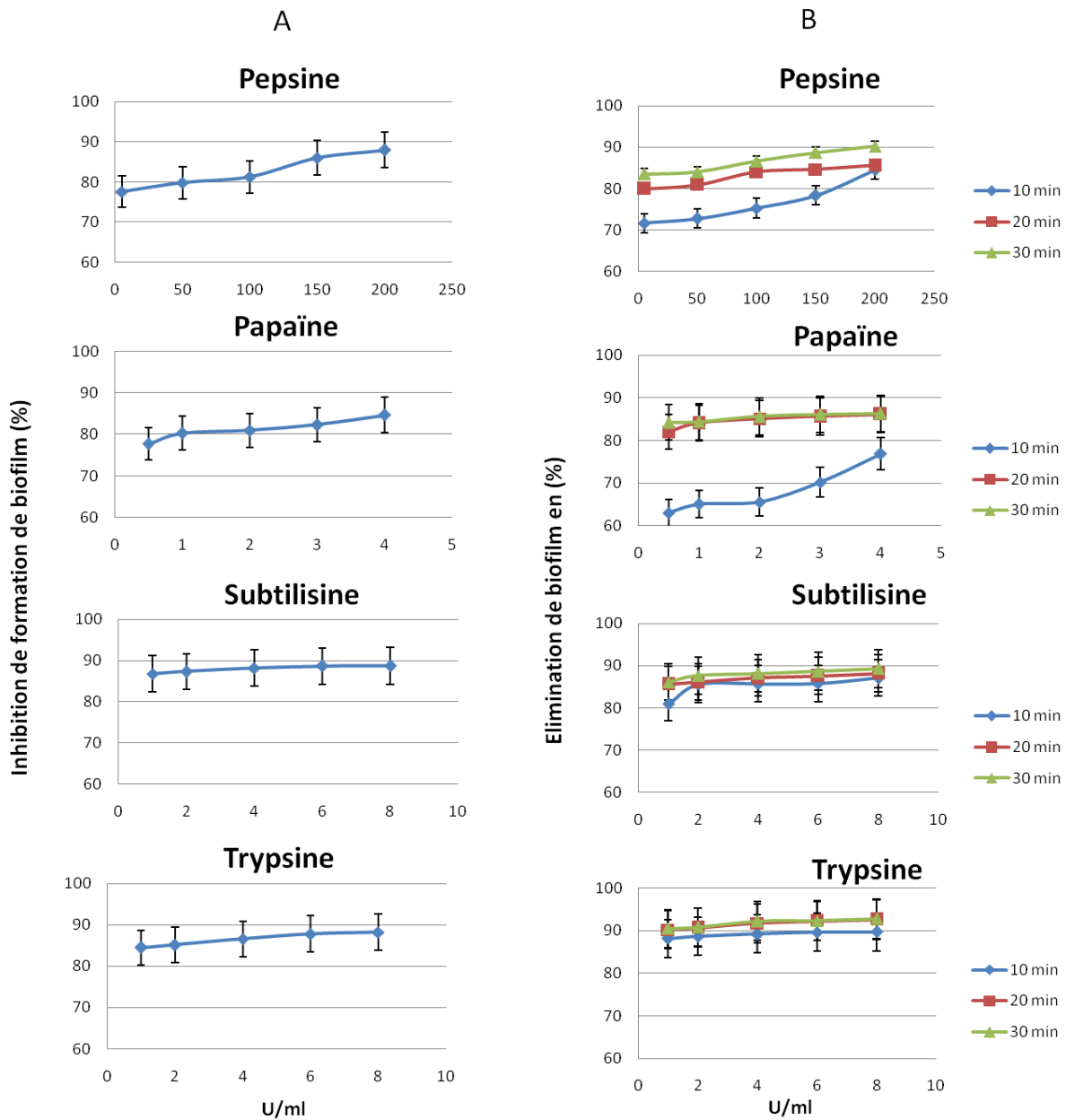


Figure 27 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur des billes d'inox introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U \cdot ml^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U \cdot ml^{-1}$).

D'ailleurs, pour le protocole de prévention, l'efficacité anti-adhésion des quatre protéases étudiées, augmente avec la concentration, en enregistrant des plateaux d'inhibition maximum

proche des 90% pour la subtilisine et la trypsine, de 88% pour la pepsine et de 85% pour la papaïne. Tandis que, pour le protocole de lavage l'efficacité anti-biofilm des quatre protéases augmente avec la concentration et en prolongeant le temps de traitement en notant des plateaux d'inhibition maximum proche de 93% pour la trypsine, de 90% pour la subtilisine et la pepsine et de 86% pour la papaïne.

2.1.4 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. pyogènes* P4

On remarque que pour le protocole de prévention un plateau d'inhibition maximum proche des 60% d'inhibition est rapidement atteint pour la subtilisine et la pepsine suivi par la trypsine puis la papaïne en notant que ce taux augmente avec la concentration en enzyme (figure 28).

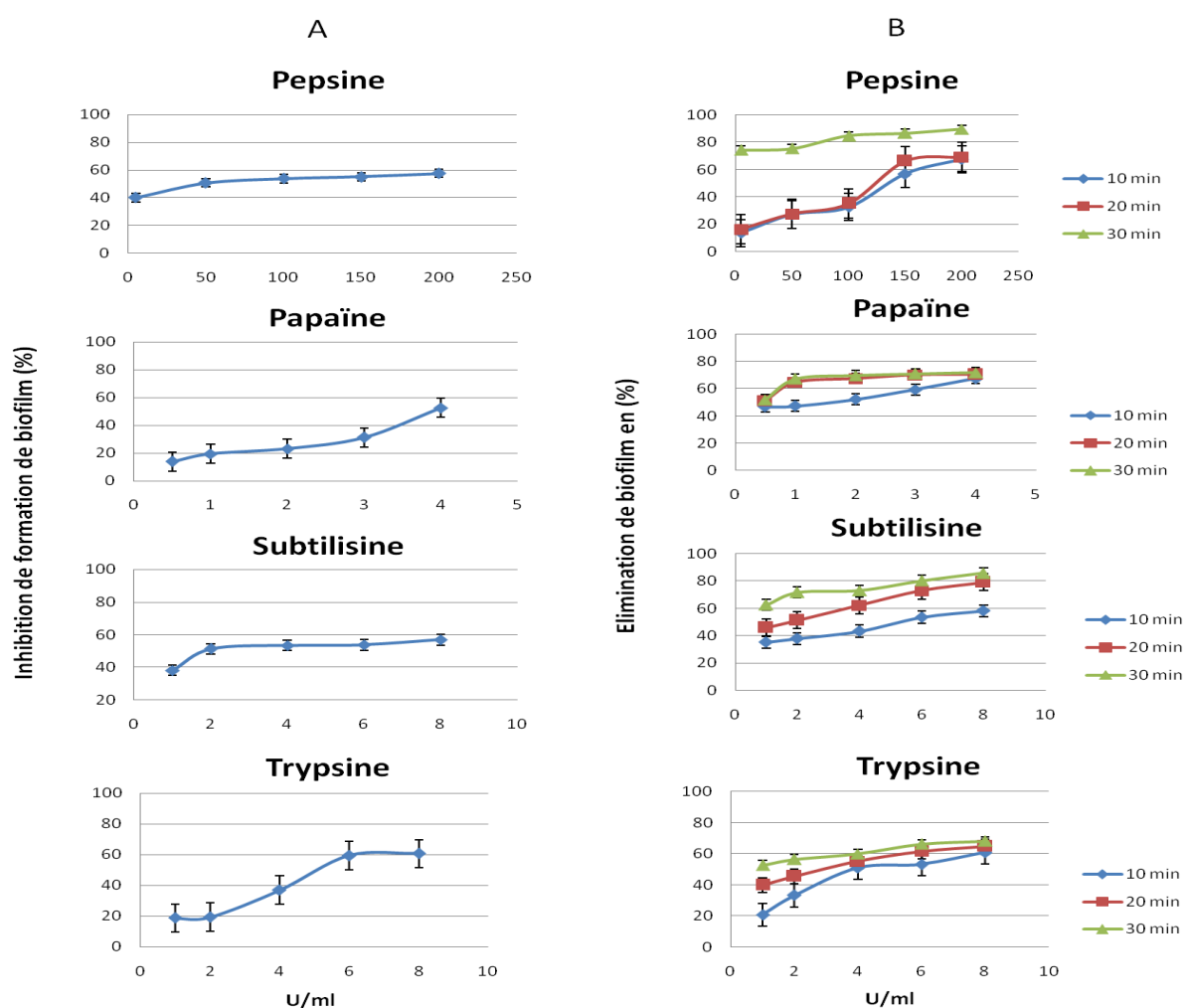


Figure 28 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. pyogènes* P4 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U.ml^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U.ml^{-1}$).

On mentionne que les quatre protéases analysées exercent un effet anti-biofilm plus important que l'effet anti-adhésion contre un biofilm de *S. pyogènes* P4 développé sur des coupons de cathéter, qui augmente avec la concentration en enzyme et en prolongeant le temps de traitement avec un optimum d'efficacité (enregistré après 30 min de traitement) marqué plus chez la pepsine de 90%, suivi par la subtilisine de 82%, puis par la papaïne de 70% et enfin la trypsine de 66%.

2.1.5 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. aureus* K1

On remarque que les quatre protéases analysées exercent un effet anti-biofilm plus important que l'effet anti-adhésion, qui augmentent avec la concentration en enzyme (pour les deux tests) et en prolongeant le temps de traitement (pour le protocole de lavage) (figure 29).

En prévention, avec la plus forte concentration analysée, la trypsine a permis l'inhibition de 90% de biofilm de *S. aureus* K1, alors que la pepsine avec une concentration 25 fois plus forte a permet l'inhibition de 62%, tandis que la subtilisine étudiée à des concentrations similaires de la trypsine a permet l'inhibition de 68% de biofilm, alors que la papaïne qui est 2 fois moins concentrée que la subtilisine et la trypsine a permis l'inhibition de 50% de biofilm. Or en lavage, avec la plus forte concentration analysée, la subtilisine a permis l'élimination de 85% de biofilm de *S. aureus* K1, tandis que la pepsine et la trypsine ont permis l'élimination de 80% de biofilm, alors que la papaïne a permis l'élimination de 75% de biofilm.

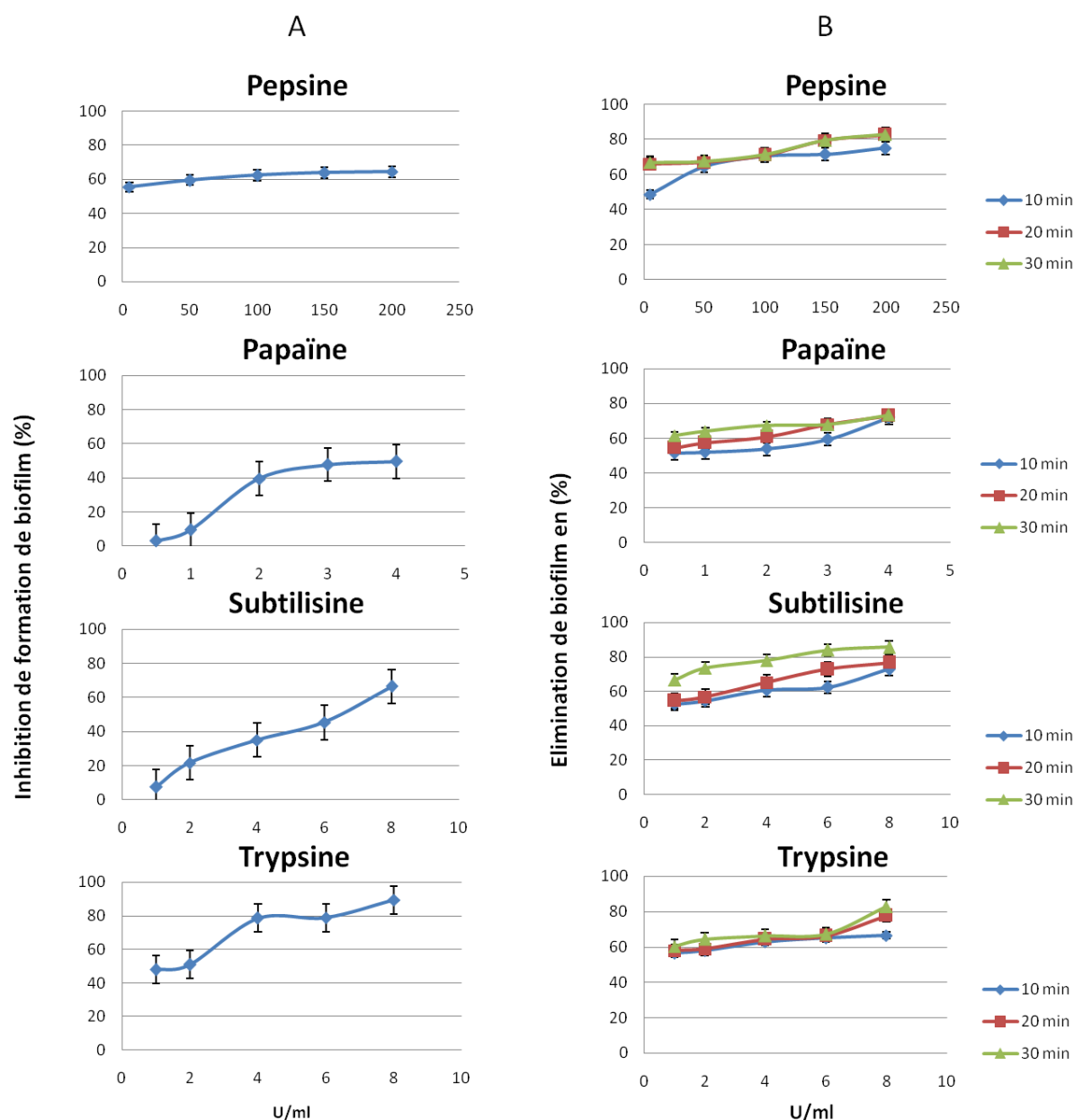


Figure 29 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d’inhibition de formation de biofilm en fonction d’unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U \cdot ml^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d’élimination de biofilm en fonction d’unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U \cdot ml^{-1}$).

2.1.6 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. sciuri* K17

On remarque, que les quatre protéases analysées, exercent un effet anti-biofilm plus important que l’effet anti-adhésion contre le biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur une microplaque de polystyrène, qui augmentent avec la concentration en enzyme (pour les deux tests) et en

prolongeant le temps de traitement (pour le protocole de lavage), jusqu'à avoir un plateau d'efficacité maximum (figure 30).

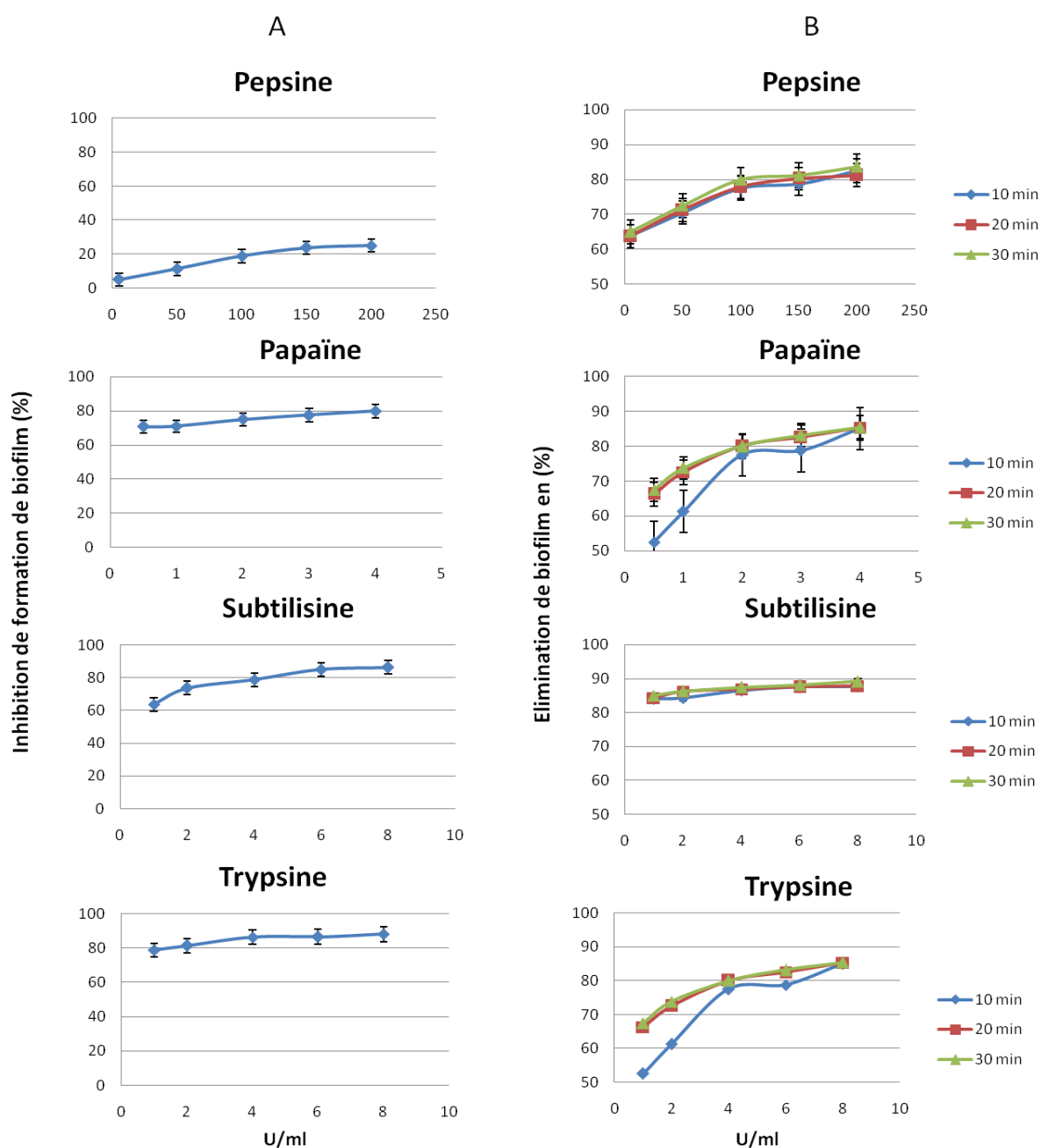


Figure 30 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaine, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur une microplaque de polystyrène. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Le potentiel préventif a enregistré des valeurs importantes, pour la plus forte concentration analysée de chaque enzyme, arrivant à environ 90% d'inhibition pour la trypsine et la subtilisine. Tandis que la papaïne (étudiée à des concentrations 2 fois inférieures à celles de la trypsine et la subtilisine) a permis d'inhiber 80% de biofilm. même si la pepsine est utilisée à des concentrations très élevées, son efficacité anti-adhésion n'a pas dépassé 27% à la plus forte concentration analysée pour cette enzyme. Or, le potentiel curatif a marqué des valeurs plus importantes, pour la plus forte concentration analysée de chaque enzyme. Arrivant à environ 90% d'inhibition pour la subtilisine et de 85% pour la trypsine (étudiée à des concentrations similaire de la subtilisine) et la papaïne (étudiée à des concentrations deux fois inférieures à la trypsine et la subtilisine). Alors que la pepsine a enregistré une efficacité anti-biofilm plus importante que celle anti-adhésion de 82%.

2.1.7 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. warneri* K9

Les valeurs obtenues sont également très reproductibles entre les deux protocoles (figure 31). D'ailleurs, pour le protocole de prévention comme de lavage l'efficacité anti-adhésion se rapproche de celle anti-biofilm des quatre protéases étudiées contre le biofilm de *S. warneri* K9 développé sur une microplaque de polystyrène qui augmente avec la concentration en enregistrant des plateaux d'inhibition maximum proche des 95%. En notant que, le prolongement du temps de traitement n'influence pas l'efficacité enzymatique.

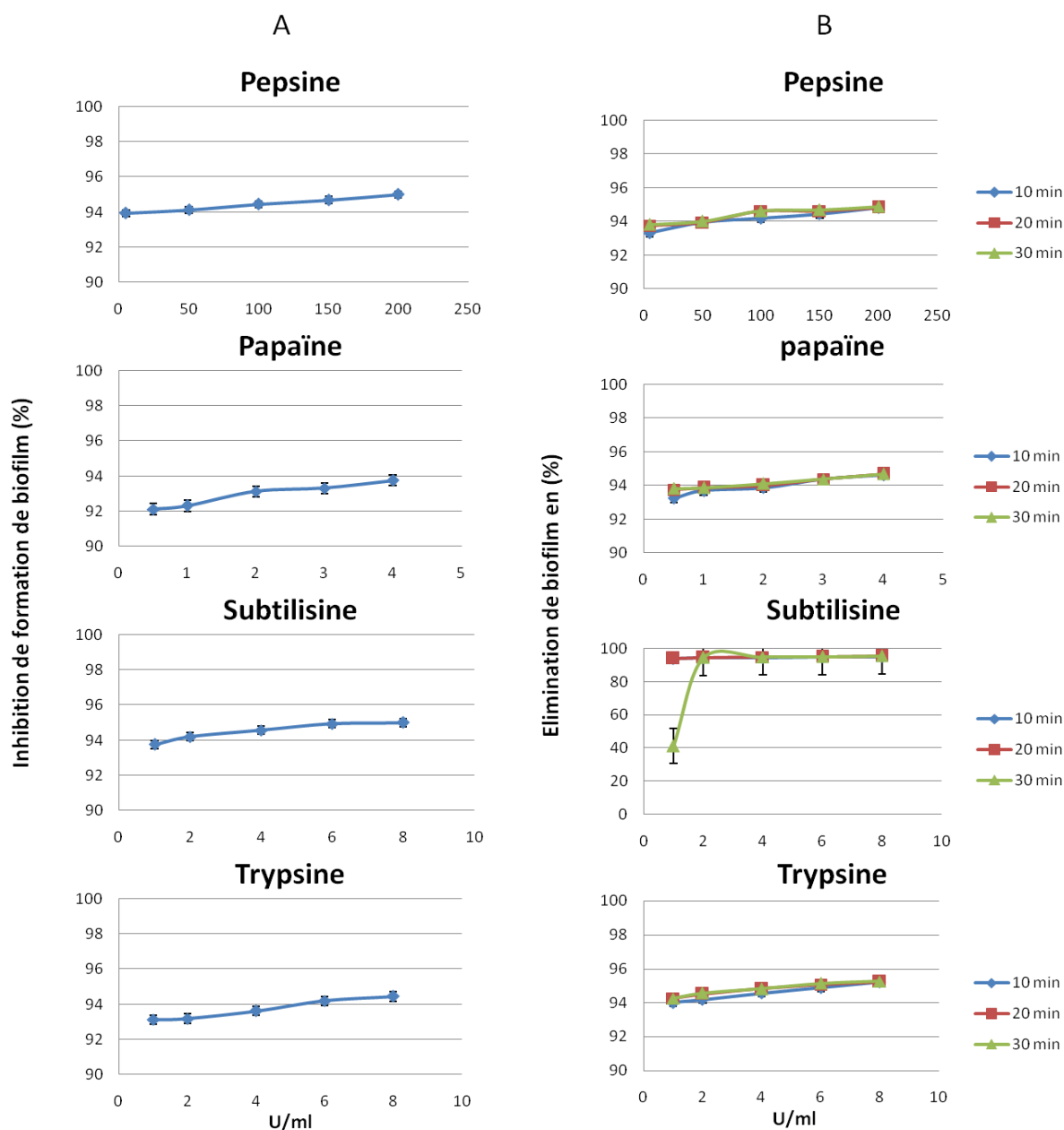


Figure 31 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de *S. warneri* K9 développé sur une microplaque de polystyrène. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U.ml^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($U.ml^{-1}$).

2.1.8 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre les sept souches (schéma récapitulatif)

On observe que *Staphylococcus warneri* K9 et *Salmonella* spp S3349 semblent les plus sensibles (figure 32). En effet, pour les 2 protocoles, un plateau de sensibilité maximum

proche des 100% est rapidement atteint. De plus, les valeurs obtenues sont très reproductibles. Il en est de même pour les quatre protéases concernant la prévention comme en lavage, mais avec une sensibilité plus marquée pour *Staphylococcus warneri* K9 que pour *Salmonella* spp S3349. Alors que *Staphylococcus sciuri* K17 est plus sensible en lavage qu'en prévention (sauf pour la trypsine, qui présente une sensibilité au contraire) avec un maximum d'efficacité anti-biofilm qui a dépassé les 80%, tandis que les autres souches semblent plus ou moins sensibles selon les deux protocoles de prévention et de lavage et selon l'enzyme étudiée avec des sensibilités inférieures à 80%. D'une manière générale, l'efficacité des protéases est meilleure en lavage d'un biofilm qu'en prévention avec un maximum d'efficacité entre 60 et 100% d'élimination en lavage et entre 27 et 100% d'inhibition en prévention.

Si on étudie le type d'activité enzymatique, en regard des pourcentages d'efficacité maximale atteints, il semblerait que la trypsine est plus efficace que la subtilisine en prévention qu'en lavage d'un biofilm, avec un maximum d'efficacité anti-adhésion atteignant les 55% pour la trypsine et 35% pour la subtilisine et cela contre la souche la moins sensible. Alors que la subtilisine au contraire, elle est plus efficace que la trypsine en lavage qu'en prévention puisqu'elles sont étudiées à des concentrations similaires avec un maximum d'efficacité anti-biofilm qui a dépassé les 60% pour les sept souches étudiées. La papaïne est plus efficace en lavage qu'en prévention avec des valeurs inférieures d'une manière minimale que la subtilisine et la trypsine sachant qu'elle est étudiée à des concentrations 2 fois moins concentrée que ces dernières, ce qui explique son efficacité qui reste aussi importante avec un maximum d'efficacité entre 60 et s'approche à 100% d'élimination en lavage et entre 27 et s'approche à 100% d'inhibition en prévention. Tandis que, la pepsine a été 50 fois plus concentrée, même avec sa forte concentration ses efficacités anti-adhésion et anti-biofilm n'ont pas dépassé les autres protéases analysées qui restent aussi importantes avec un maximum d'efficacité entre 60 et s'approche de 100% d'élimination en lavage et entre 27 et s'approche de 100% d'inhibition en prévention.

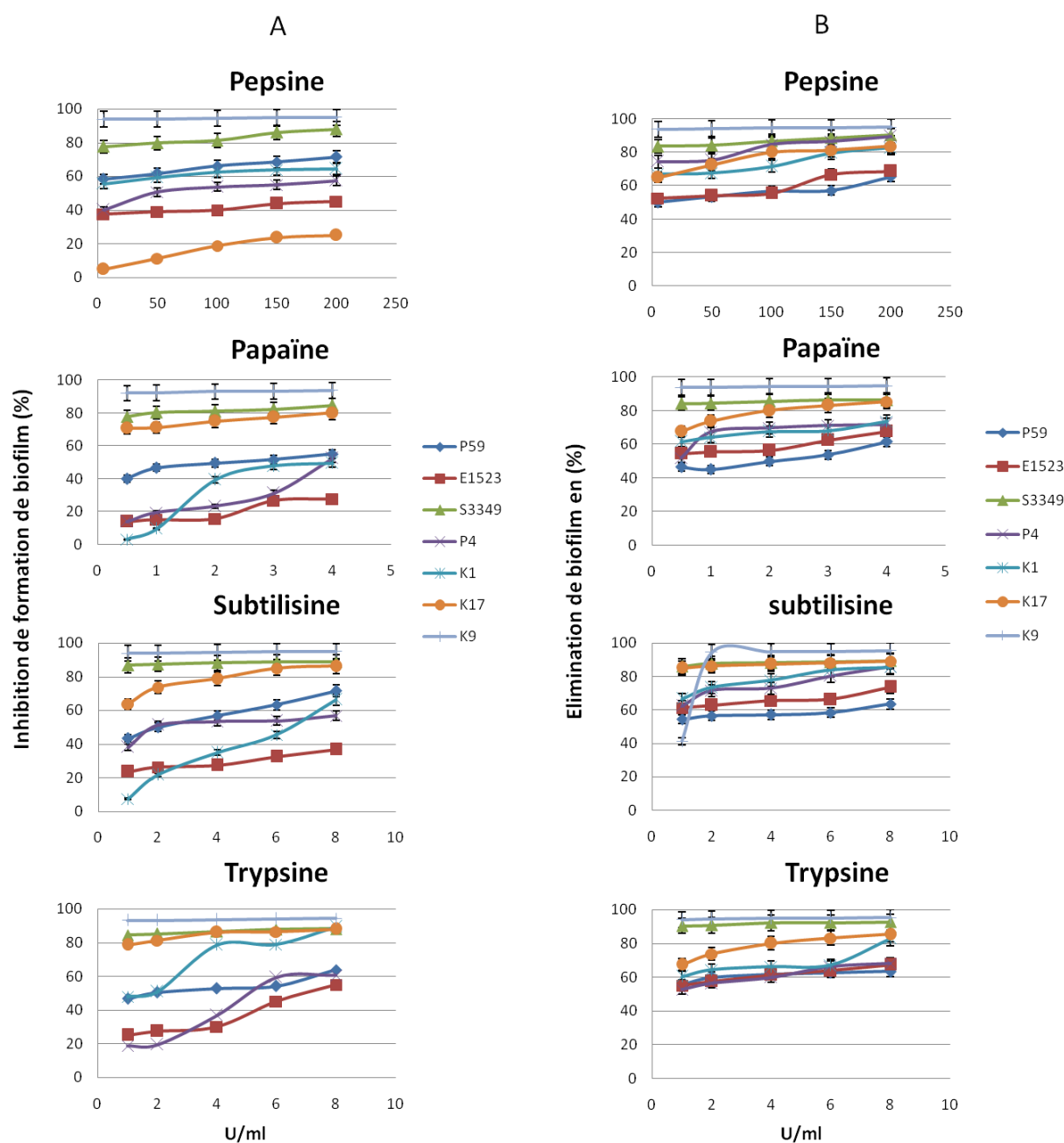


Figure 32 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre protéases (pepsine, papaïne, subtilisine et trypsine) testées contre le biofilm de sept souches bactériennes présentant trois secteurs différents (secteur agroalimentaire : présenté par *E. coli* E1525 sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 sur des billes d’innox ; secteur médical : présenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4 sur des coupons de cathéter ; secteur environnemental : présenté par *P. aeruginosa* P59 sur des coupons cylindriques de polyéthylène). Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d’inhibition de formation de biofilm en fonction d’unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d’élimination de biofilm en fonction d’unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) après 30 min de traitement.

2.2 Glycosidases

De la même manière que pour les protéases, l'effet des glycosidases a été testé sur les biofilms de sept souches bactériennes développés sur les supports correspondant (verre, inox, cathéter, polystyrène et tuyau de polyéthylène) introduits en microplaque. Les résultats comportant tous les points expérimentaux sont présentés sur la Figure 33 jusqu'à la Figure 40 par activité, en donnant les pourcentages d'élimination et d'inhibition de formation de biofilm en fonction de la concentration en unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}) des quatre glycosidases testées. Sachant que la xylanase a été étudiée à des concentrations vingt fois plus concentrée que la cellulase et la β -glucanase, tandis que la pectinase a été étudiée par dilution en deux allant de 1/4 à 1/64 car elle était sous forme liquide.

2.2.1 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *P. aeruginosa* P59

La forme des courbes des pourcentages d'inhibition, en fonction de la concentration en activité enzymatique, concernant le criblage des glycosidases présente peu de droite exponentielle. On observe plutôt des plateaux d'efficacité maximales qui atteignent leur maximum d'efficacité entre 65 et 75% d'effets anti-adhésion et anti-biofilm. En effet, pour le protocole de lavage le prolongement du temps de traitement augmente l'activité anti-biofilm de la xylanase et la cellulase, alors qu'il reste sans influence bien apparue sur la β -glucanase et la pectinase. D'ailleurs, la xylanase et la cellulase ont enregistré un effet anti-adhésion plus important que l'effet anti-biofilm, alors que la pectinase a présenté des activités anti-adhésion et anti-biofilm similaires tandis que la β -glucanase a enregistré une activité anti-biofilm importante que celle anti-adhésion.

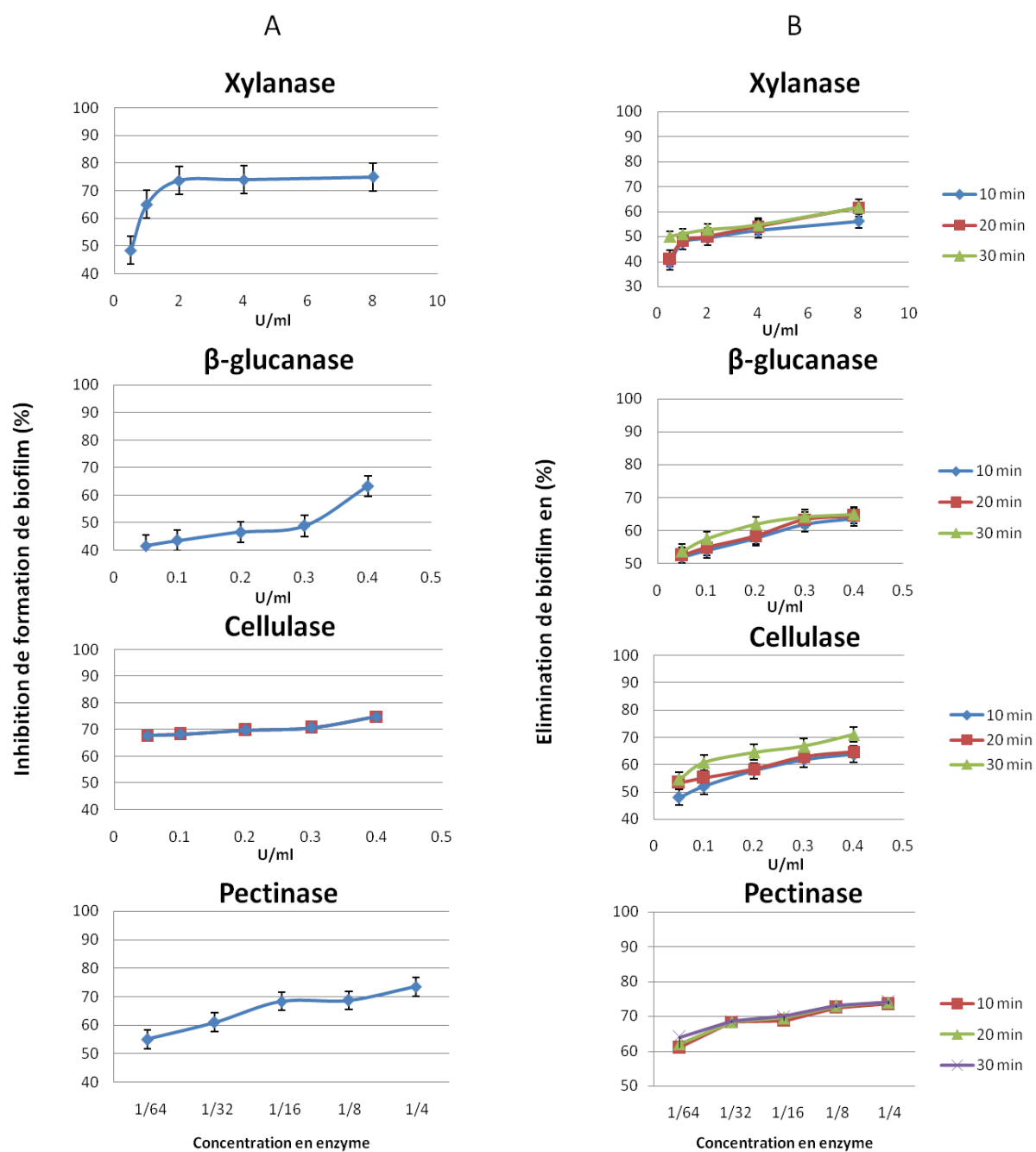


Figure 33 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *P. aeruginosa* P59 développé sur des coupons cylindriques de tuyau de polyéthylène introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

2.2.2 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *E. coli* E1523

Les glycosidases analysées exercent un effet anti-biofilm plus important que l'effet anti-adhésion sauf pour la pectinase, ces activités augmentent avec la concentration en enzyme (pour les deux tests) et en prolongeant le temps de traitement (pour le protocole de lavage) avec un optimum d'efficacité anti-biofilm enregistré après 20 min de traitement (figure 34).

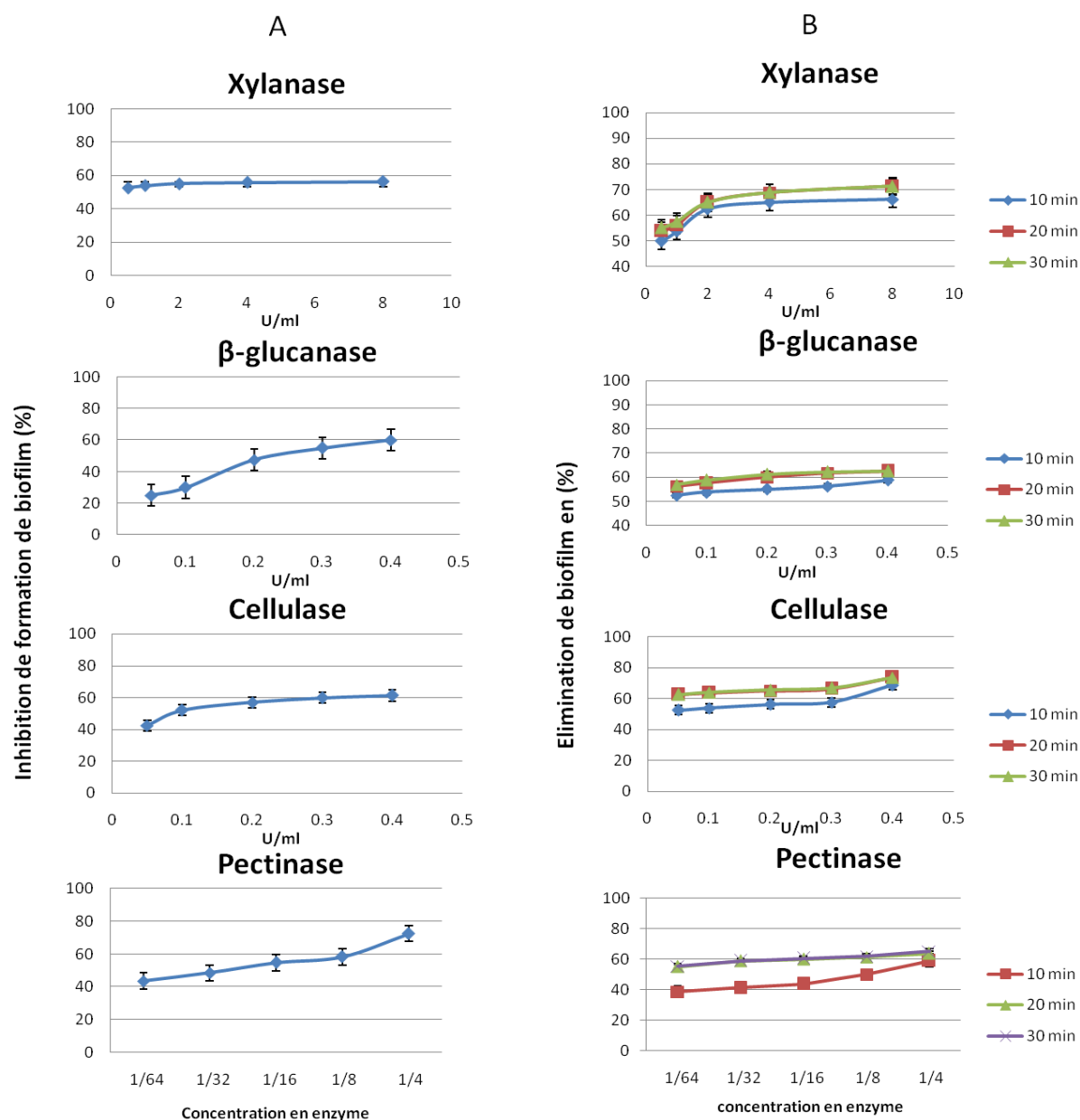


Figure 34 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm d'*E. coli* E1523 développé sur des billes de verre introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

En prévention, avec la plus forte concentration analysée, la pectinase a permis l'inhibition de 70% de biofilm d'*E. coli* E1523 développé sur des billes de verre, alors que la cellulase et la β -glucanase ont permis l'inhibition de 60% de biofilm, tandis que la xylanase (étudiée à des concentrations 20 fois plus concentrée que la cellulase et la β -glucanase) a atteint rapidement un plateau d'inhibition maximum proche de 58% d'inhibition de formation de biofilm. Or en lavage, avec la plus forte concentration analysée, la xylanase et la cellulase ont permis l'élimination de 70% de biofilm d'*E. coli* E1523 développé sur des billes de verre, tandis que la pectinase et la β -glucanase ont permis l'élimination de 62% de biofilm.

2.2.3 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *Salmonella* spp S3349

La forme des courbes des pourcentages d'efficacités, en fonction de la concentration en activité enzymatique, concernant le criblage des glycosidases, présente des plateaux d'efficacités maximales qui atteignent rapidement leur maximum d'efficacité qui s'approche de 90% d'effet anti-adhésion et de 92% d'effet anti-biofilm. En notant que le potentiel curatif (effet anti-biofilm) des quatre glycosidases est plus marqué que le potentiel préventif (effet anti-adhésion). En effet, pour le protocole de lavage le prolongement du temps de traitement augmente l'activité anti-biofilm des glycosidases étudiées sauf pour le cas de la β -glucanase ou l'augmentation en fonction du temps de traitement est très faible (figure 35).

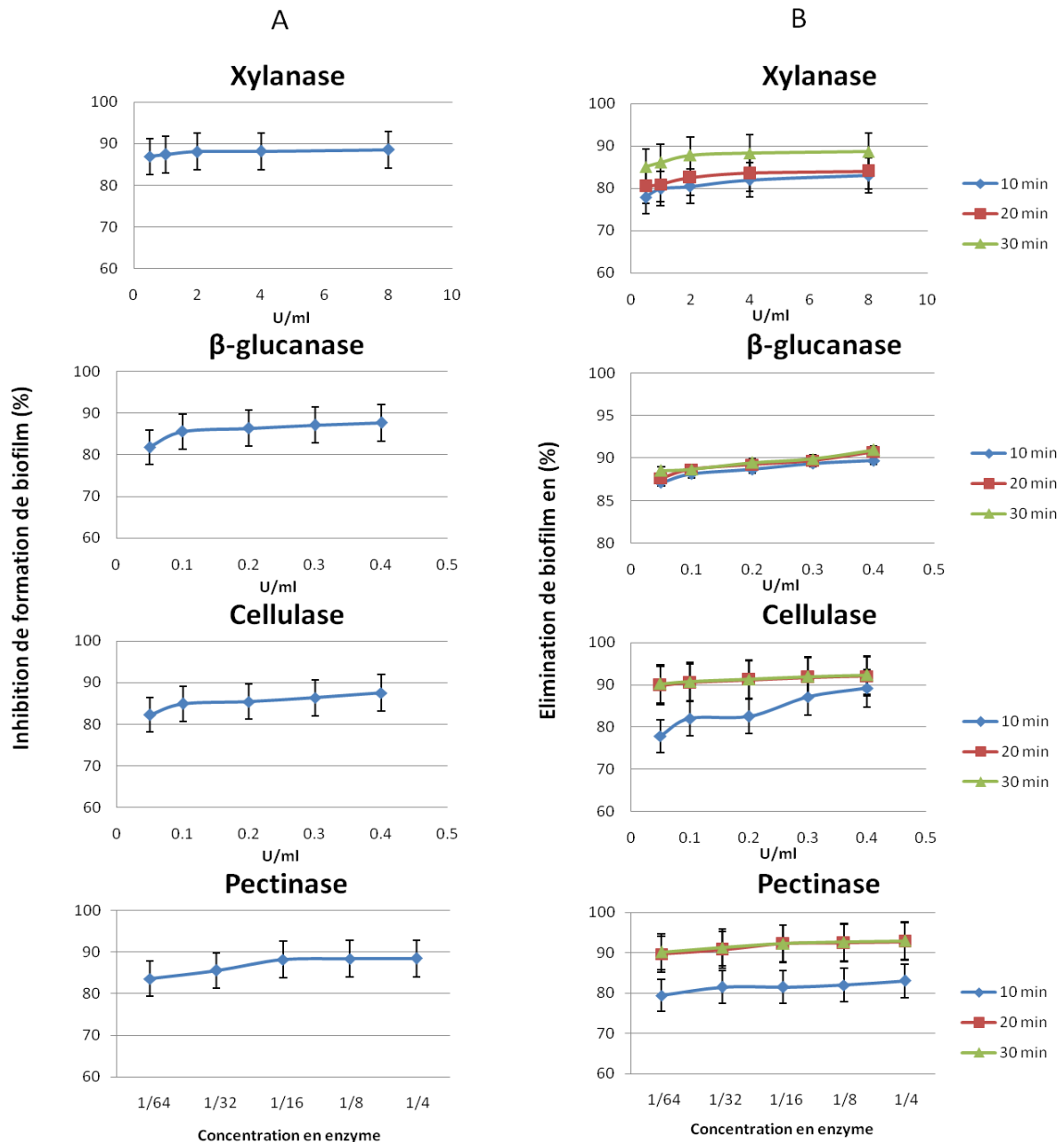


Figure 35 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur des billes d'inox introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

2.2.4 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. pyogènes* P4

La forme des courbes des pourcentages d'inhibition, en fonction de la concentration en activité enzymatique, concernant le criblage des glycosidases présente peu de plateaux d'inhibition maximale (figure 36).

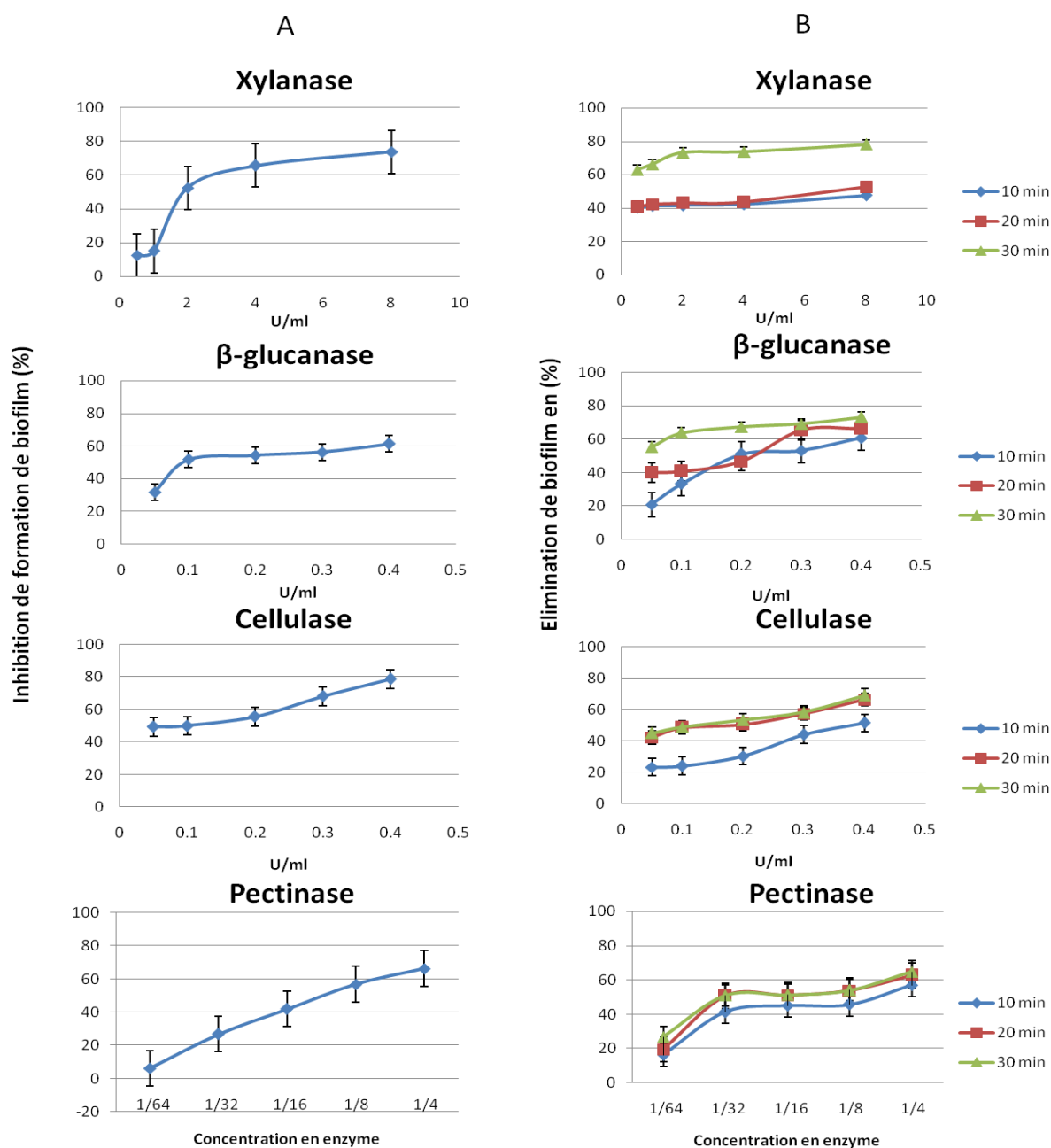


Figure 36 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β-glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. pyogènes* P4 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

On observe, plutôt, des courbes exponentielles qui atteignent leur maximum d'efficacité entre 60 et 80% d'activités anti-adhésion et anti-biofilm. Ces activités augmentent avec la concentration en enzyme (pour les deux tests) et en prolongeant le temps de traitement (pour le protocole de lavage) avec un optimum d'efficacité anti-biofilm enregistré après 20 min de traitement pour la pectinase et la cellulase, et après 30 min pour la xylanase et la β -glucanase. La cellulase s'est révélée plus efficace que la β -glucanase en prévention, alors que leur effet est inversé en lavage (sachant qu'elles sont étudiées à des concentrations similaires). Tandis que la pectinase a présenté un effet anti-biofilm plus marqué que son effet anti-adhésion. alors que la xylanase a montré aussi un effet anti-biofilm plus marqué que son effet anti-adhésion (sachant qu'elle est étudiée à des concentrations vingt fois plus élevées que la β -glucanase et la cellulase).

2.2.5 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. aureus* K1

Les glycosidases analysées exercent un effet anti-biofilm plus important que l'effet anti-adhésion, et que ces activités augmentent avec la concentration en enzyme (pour les deux tests) et en prolongeant le temps de traitement (pour le protocole de lavage) jusqu'à avoir un plateau d'efficacité. En prévention, avec la plus forte concentration analysée, la cellulase et la β -glucanase ont un effet anti-adhésion qui se rapproche en atteignant un plateau d'inhibition de 42% de biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter, alors que la xylanase a enregistré un plateau d'inhibition de 40% (sachant qu'elle est étudiée à des concentrations vingt fois plus concentrée que la β -glucanase et la cellulase), tandis que la pectinase a atteint rapidement un plateau d'inhibition maximum proche de 60% d'inhibition de formation de biofilm. Or en lavage, avec la plus forte concentration analysée, la pectinase et la xylanase ont permis l'élimination de 80% de biofilm, tandis que la β -glucanase et la cellulase ont permis l'élimination de 75% de biofilm de *S. aureus* K1 (figure 37).

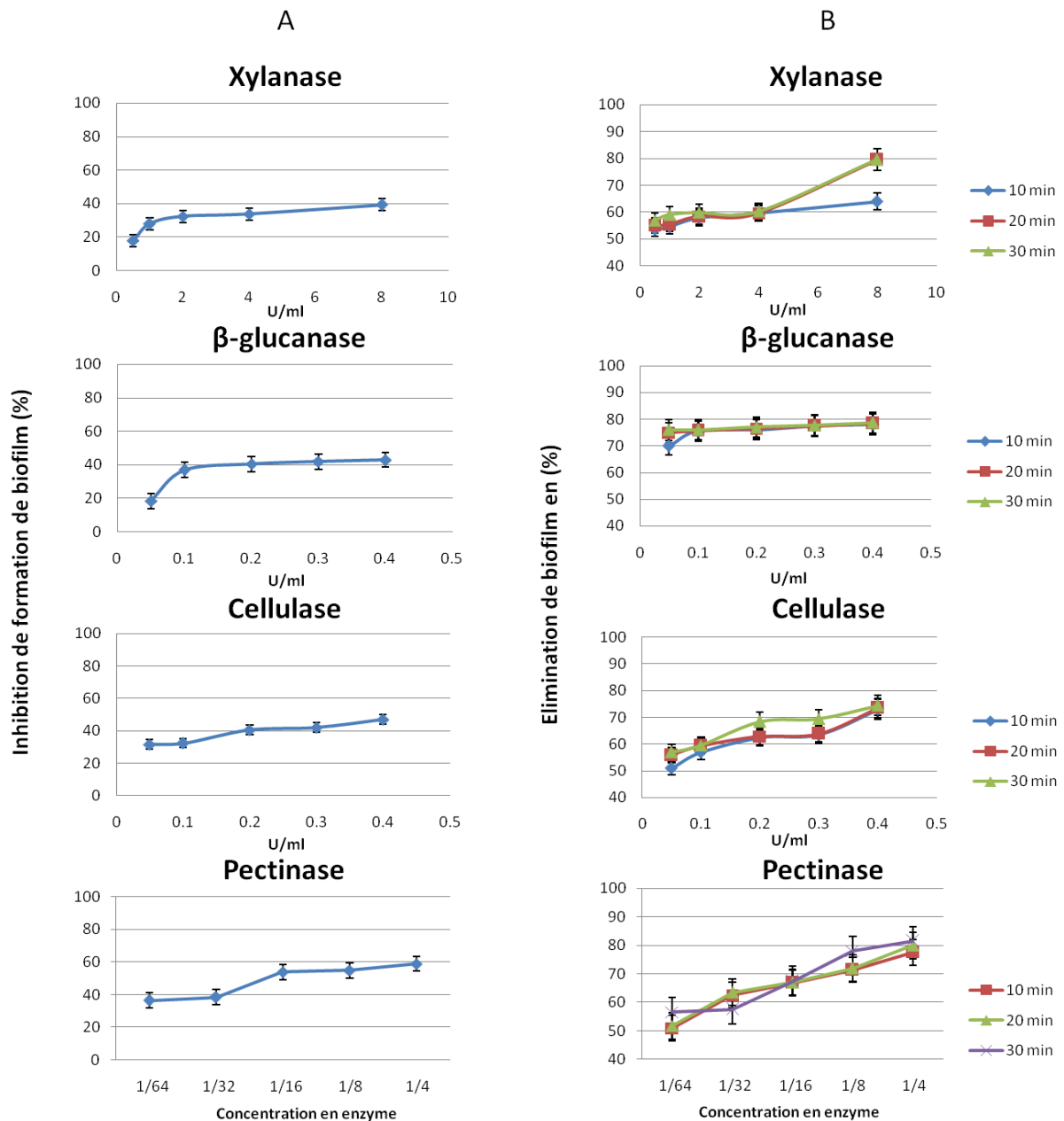


Figure 37 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. aureus* K1 développé sur des coupons de cathéter introduits en microplaque. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

2.2.6 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. sciuri* K17

D'après la figure 38, en prévention on observe plutôt des plateaux d'inhibition qui atteignent leur maximum d'efficacité entre 50 et 80% d'activités anti-adhésion.

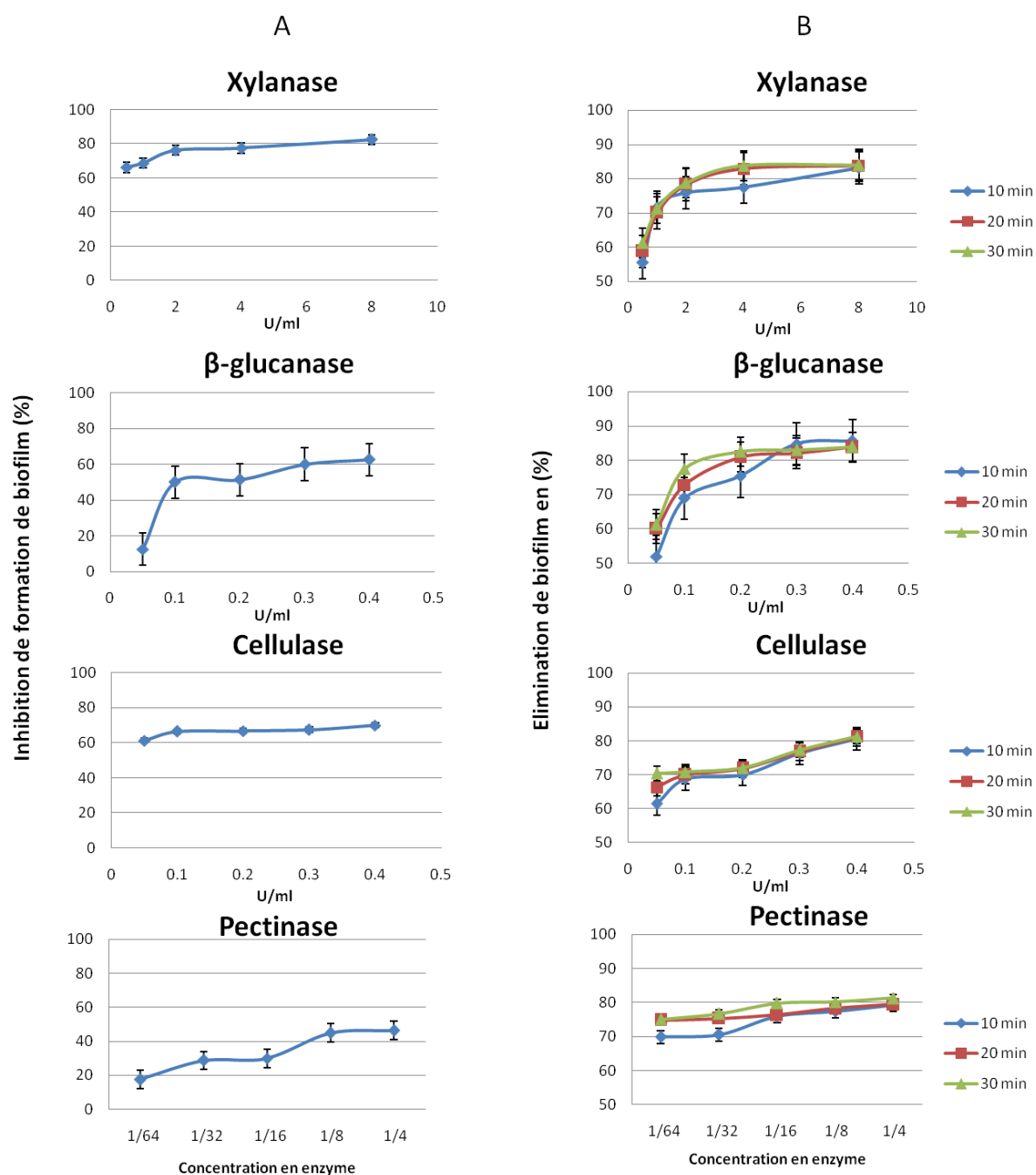


Figure 38 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β-glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. sciuri* K17 développé sur des microplaques en polyéthylène. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$).

La cellulase a été trouvée plus efficace que la β -glucanase avec un optimum d'activité anti-adhésion de 70% plutôt que 60% pour la β -glucanase. Tandis que, la xylanase a enregistré un plateau d'inhibition de 80% sachant qu'elle est concentrée 20 fois plus que la cellulase et la β -glucanase. Alors que, la pectinase a enregistré un plateau d'inhibition de 50%. Or, en lavage les quatre glycosidases analysées ont montré une activité anti-biofilm aussi importante qu'en prévention. La β -glucanase a été trouvée plus efficace que la cellulase avec un plateau d'activité anti-biofilm de 85% plutôt que 80% pour la cellulase. Tant que, la xylanase a enregistré un plateau d'élimination de 85%. Alors que, la pectinase a marqué un plateau d'élimination de 85%. En notant que le prolongement du temps de traitement augmente l'activité anti-biofilm d'une manière significative.

2.2.7 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre *S. warneri* K9

Les valeurs obtenues sont très reproductibles entre les deux protocoles. D'ailleurs, pour le protocole de prévention comme de lavage l'efficacité anti-adhésion se rapproche de celle anti-biofilm des quatre glycosidases étudiées contre le biofilm de *S. warneri* K9 développé sur des microplaques de polystyrène qui augmente avec la concentration en enregistrant des plateaux d'activités maximum qui atteignent rapidement des pourcentages proches de 96%. En notant que, le prolongement du temps de traitement influence faiblement l'efficacité enzymatique (figure 39).

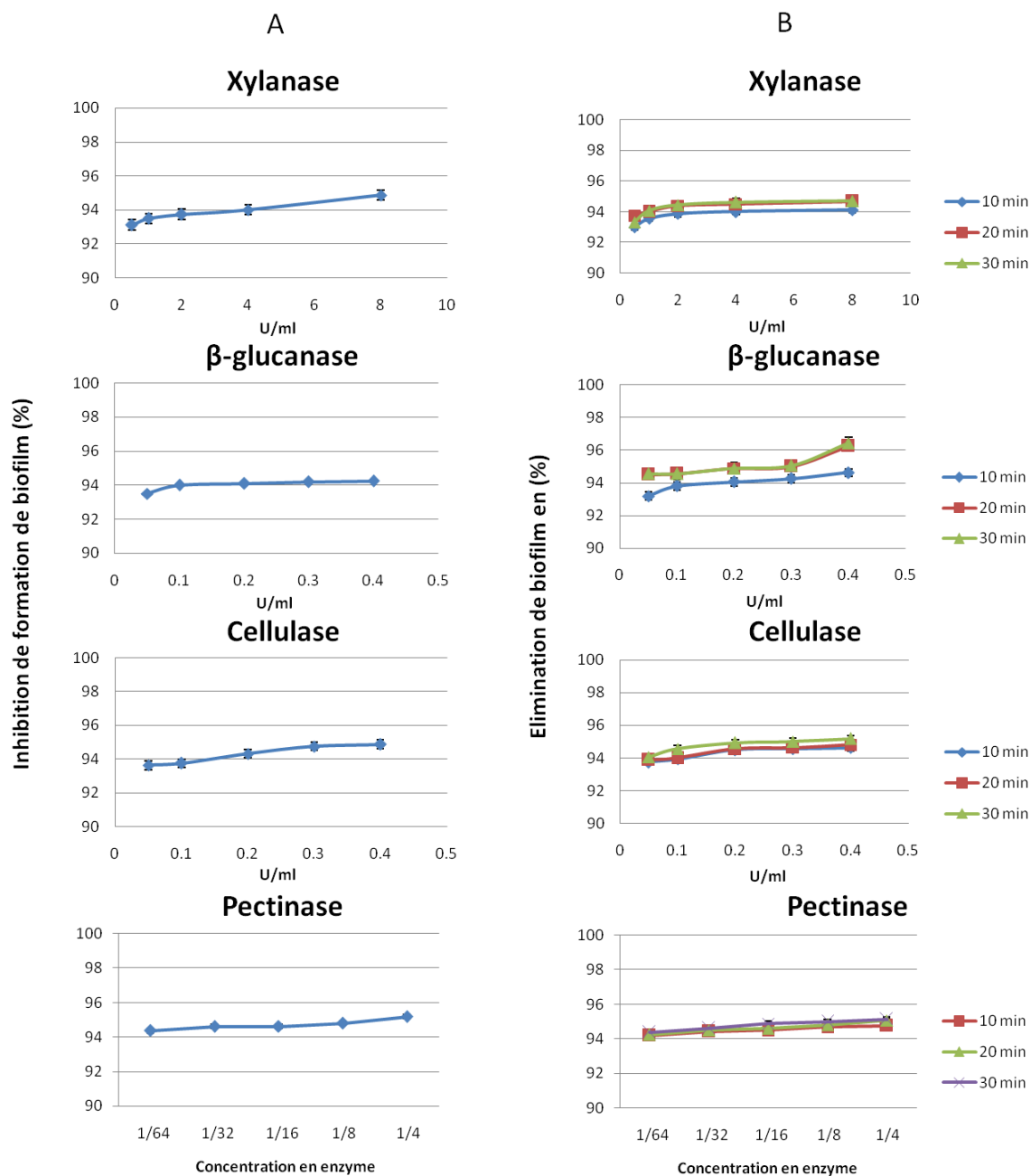


Figure 39 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β-glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de *S. warneri* K9 développé sur des microplaques en polyéthylène. Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel (U.ml^{-1}).

2.2.8 Potentiel anti-adhésion et anti-biofilm contre les sept souches (schéma récapitulatif)

La forme des courbes des pourcentages d'inhibition, en fonction de la concentration en activité enzymatique, concernant le criblage des glycosidases présente beaucoup de plateau d'inhibition maximale qui atteignent leur maximum d'efficacité entre 60 et 96% d'élimination en lavage et entre 40 et 96% d'inhibition en prévention. En effet, toutes les glycosidases analysées présentent un effet anti-biofilm plus important que l'effet anti-adhésion. Elles sont suffisamment efficaces, en prévention comme en lavage, avec des activités qui approchent les 100% sur *Staphylococcus warneri* K9 et *Salmonella* spp S3349, alors que *Staphylococcus sciuri* K17 est plus sensible en lavage qu'en prévention avec un maximum d'efficacité anti-biofilm qui a dépassé les 80%, tandis que les autres souches semblent plus ou moins sensibles selon les deux protocoles de prévention et de lavage et selon l'enzyme étudiée avec des sensibilités inférieures à 80%.

Si on étudie le type d'activité enzymatique, en regard des pourcentages d'efficacités maximales atteints, il semblerait que la β -glucanase et la cellulase soient plus efficaces que la xylanase et la pectinase. Par enzyme, la cellulase présente une très bonne activité en lavage, avec un profil proche de celui de la β -glucanase, ainsi qu'un maximum d'efficacité atteignant les 70% et cela contre la souche la moins sensible. La xylanase semble plus intéressante également en lavage qu'en prévention, sachant qu'elle est étudiée à des concentrations 20 fois plus concentrée que la β -glucanase et la cellulase. Elle présente un profil d'inhibition linéaire dont les valeurs maximales d'inhibition sont de 95% en prévention et en lavage avec la souche étudiée la plus sensible. Comme pour la pectinase, elle semble présenter en lavage des courbes avec des plateaux d'activité avec un maximum d'élimination à une concentration optimale.

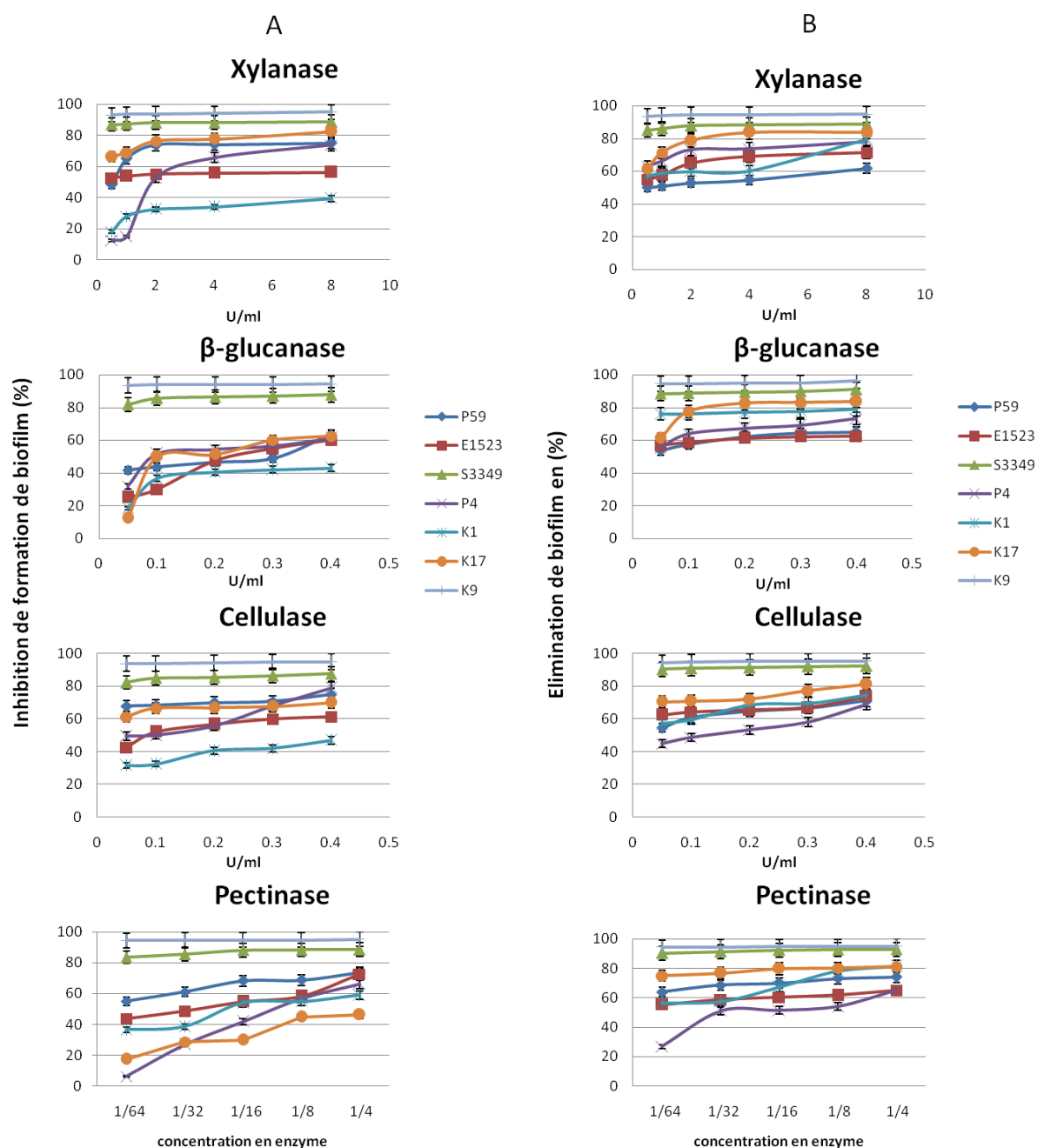


Figure 40 : Potentiel préventif (A) et curatif (B) des quatre glycosidases (xylanase, β -glucanase, cellulase et pectinase) testées contre le biofilm de sept souches bactériennes présentant trois secteurs différents (secteur agroalimentaire : présenté par *E. coli* E1525 sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 sur des billes d'inox ; secteur médical : présenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4 sur des coupons de cathéter ; secteur environnemental : présenté par *P. aeruginosa* P59 sur des coupons cylindriques de polyéthylène). Le potentiel préventif (potentiel anti-adhésion) est exprimé en pourcentage d'inhibition de formation de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Le potentiel curatif (potentiel anti-biofilm) est exprimé en pourcentage d'élimination de biofilm en fonction d'unités glycosidases par millilitre de milieu réactionnel ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) après 30 min de traitement.

2.3 Discussion

De nombreux agents antimicrobiens ne parviennent pas à pénétrer le biofilm en raison de l'EPS, qui agit comme une barrière protégeant les cellules bactériennes à l'intérieur. L'alternative sera l'utilisation de composés qui peuvent dégrader les EPS du biofilm (Loiselle et Anderson, 2003 ; Walker et al, 2007). Les enzymes ont été prouvées être efficace pour la dégradation des EPS des biofilms (Johansen et al, 1997 ; Melo et Bott, 1997 ; Lequette et al, 2010). Les enzymes suppriment les biofilms directement en détruisant l'intégrité physique de l'EPS (Liu et al, 2004 ; Xavier et al, 2005), par un mécanisme qui consiste à affaiblir les protéines, les glucides et les lipides constituant les structures des EPS par le processus de dégradation. Pour une élimination efficace du biofilm, il est donc important que les composants structurels de l'EPS soient connus avant l'application des enzymes concernées. Pour connaître la nature des EPS une étude plus approfondie sur les EPS produits par les bactéries modèles utilisées dans cette présente étude sera réalisée dans le chapitre 6.

Dans la présente étude, les enzymes (4 protéases et 4 glycosidases) ont été testés pour l'éradication des biofilms de sept bactéries modèles de trois secteurs : environnemental, médical et agroalimentaire. Au regard des maxima de pourcentage d'efficacité atteints, l'effet des protéases apparait supérieur à celui des glycosidases en prévention comme en lavage pour les trois souches de *Staphylococcus* (*aureus*, *sciuri* et *warneri*). Alors que pour *P. aeruginosa* P59 et *Salmonella* spp S3349, l'effet des glycosidases semble supérieur à celui des protéases en prévention comme en lavage. Tandis que pour *E. coli* E1525 et *Streptococcus pyogènes* P4, l'effet des glycosidases apparait supérieur à celui des protéases en prévention, or en lavage il semble que les protéases présentent une efficacité ayant une tendance à augmenter par rapport à la prévention d'un biofilm. La raison de différence d'efficacité de certaines enzymes vis-à-vis d'un biofilm ou d'un autre peut être en raison de distinction aux niveaux des composants structurels spécifiques des EPS de biofilms testés dans cette étude. La manière dont les enzymes dégradent leurs cibles dans l'EPS est l'hydrolyse, et par liaison aux molécules ciblées elles les convertissent en unités plus petites qui peuvent être transportées à travers les membranes cellulaires et ensuite métabolisées. Le mode d'action enzymatique dépendra donc de la structure spécifique de la protéine ou le glucide ciblé qui va à son tour déterminer son efficacité.

Si l'on regarde l'ensemble des Résultats, il semble que *Staphylococcus warneri* K9 et *Salmonella* spp S3349 sont les plus sensibles. En effet, pour les 2 protocoles des plateaux de

sensibilité maximale proche des 100% est rapidement atteints. De plus les valeurs obtenues sont très reproductibles. Il en est de même pour les huit enzymes concernant la prévention comme le lavage, mais avec une sensibilité plus marquée pour la *Staphylococcus warneri* K9 que *Salmonella* spp S3349. Alors que *Staphylococcus sciuri* K17 est plus sensible en lavage qu'en prévention (sauf pour la trypsine, qui présente une sensibilité à l'inverse) avec un maximum d'efficacité anti-biofilm qui a dépassée les 80%, tandis que les autres souches semblent plus au moins sensibles selon les deux protocoles de prévention et de lavage et selon l'enzyme étudiée avec des sensibilités inférieures à 80%. D'une manière générale, les protéases et les glycosidases présentent une efficacité ayant une tendance à augmenter en lavage par rapport à la prévention d'un biofilm. En règle générale, une matrice de biofilm est principalement composée de polysaccharides et de protéines (Tsuneda et al, 2003) associés à des lipides ou des acides nucléiques (Flemming et Wingender, 2010), mais sa composition peut afficher des variations qualitatives et quantitatives selon les souches et les conditions de croissances impliquées (Branda et al, 2005).

Ces résultats semblent prometteurs. Dans nos modèles de biofilms développés sur différents supports introduits en microplaque, selon la nature des préparations enzymatiques testées et selon le protocole de lavage ou de prévention, différentes efficacités anti-adhésion et anti-biofilm peuvent être observées. Nous allons donc discuter des mécanismes pouvant être impliqués dans ce phénomène.

2.3.1 Efficacité des enzymes et nature des molécules organiques ciblées

Plusieurs composants structuraux des EPS peuvent être dérivés de protéines, des glycoprotéines, des glycolipides, acides nucléiques, des phospholipides, y compris les substances humiques qui sont des substances non cellulaires (Liu et al, 2004). Les protéases et les glycosidases permettent d'atteindre des pourcentages d'inhibition et d'élimination de biofilm qui diffèrent d'une souche à une autre en ayant une tendance à augmenter en lavage par rapport à la prévention d'un biofilm. Des études de composition d'EPS lyophilisée des sept bactéries modèles analysées dans cette étude ont montré une forte proportion en protéines qu'en polysaccharides (voir chapitre 6). L'efficacité supérieure des protéases sur celle des glycosidases pour inhiber l'adhésion des trois souches de *Staphylococcus* (*aureus*, *sciuri* et *warneri*) notamment en prévention semble corrélée avec la présence majoritaire de groupements RNH_2 , caractéristiques des protéines, plutôt que des groupements RCOO^- , caractéristiques des polysaccharides, en extrême surfaces de ces souches, et au contraire pour

les autres souches où les glycosidases se sont révélées plus efficace que les protéases en prévention peut être corrélée avec la présence majoritaire de groupements RCOO^- , caractéristiques des polysaccharides, plutôt que des groupements RNH_2 , caractéristiques des protéines, en extrême surface de ces souches. Des études de physicochimie de surface de *Pseudoalteromonas sp.* D41 ont permis de montrer qu'elle possède une surface plus riche en protéines qu'en polysaccharides (Rubio, 2002 ; Pradier et al, 2005). En effet, des analyses d'extrême surface en spectroscopie de photoélectrons induite par rayons X (XPS) sur D41 lyophilisée ont montré une forte proportion de groupements aminés et une faible proportion de groupements oxygénés, cette observation a été complétée par des tests d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) de la D41 en solution montrant un caractère électron-donneur et électron accepteur faible, attribué principalement à la présence de groupements RNH_2 à la surface de la bactérie ce qui a expliqué l'efficacité supérieure des protéases sur celle des glycosidases pour inhiber l'adhésion de la *Pseudoalteromonas sp.* D41 notamment en prévention (Leroy, 2006). D'autres études de physicochimie de surface de *Pseudomonas aeruginosa* P59 (Ghazlane et al, 2014) et de *Salmonella spp* S3349 (Oufrid et al, 2014) montrent que ces souches ont un caractère hydrophile comme elles sont fortement donneurs d'électrons et faiblement accepteurs d'électrons. L'importance de ce caractère donneur d'électron peut être attribuée à la présence de groupements basiques exposés à la surface cellulaire, comme les groupements carboxyles (COO^-), ce qui explique l'efficacité supérieure des glycosidases à celle des protéases notamment en prévention. L'efficacité des protéases ou des glycosidases en prévention serait donc liée à la composition d'extrême surface des sept bactéries étudiées, avant qu'elles ne produisent la matrice extracellulaire du biofilm, suggérant que ces enzymes agiraient directement sur les molécules de surface des bactéries. Certaines enzymes peuvent agir directement sur des molécules membranaires comme Glucanex, utilisée en œnologie pour extraire les protéines membranaires à GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) de la paroi cellulaire des levures (de Sampaio et al, 1999), impliquées dans des mécanismes d'adhésion cellulaire.

La capacité du biofilm à se développer en présence d'enzyme diffère selon les activités enzymatiques mais également selon le protocole utilisé. Les protéases comme les glycosidases sont plus efficaces en lavage qu'en prévention. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que l'efficacité des enzymes serait corrélée à la nature des molécules organiques composant le biofilm au cours de sa formation. L'excrétion d'exopolysaccharides dans la matrice extracellulaire est décrite dans la littérature comme le résultat d'une cascade

de changements physiologiques, induite par la densité cellulaire (Allison et Sutherland, 1987). De plus, certaines enzymes interférant dans les cascades d'activation du QS (Roche et al, 2004 ; Itoh et al, 2005), ensemble de signaux permettant aux bactéries de percevoir la densité de population bactérienne et de coordonner une réponse à cette information via la régulation de certains gènes (Fuqua et al, 1994), et d'autres intervenant directement sur les polysaccharides de la matrice (Wiater et al, 2004) présentent chacune un potentiel anti-biofilm. Ainsi, il existerait plusieurs voies possibles permettant d'inhiber la formation de biofilms via l'utilisation d'hydrolases. Les glycosidases agissent sur les molécules d'extrême surface des bactéries impliquées dans les phases initiales d'adhésion et permettraient davantage de perturber la matrice du biofilm déjà formé, alors que les protéases pourraient interférer soit au niveau des cascades d'activation aboutissant à la synthèse des EPS ou comme décrit précédemment sur les molécules d'extrême surface des bactéries impliquées dans les phases initiales d'adhésion.

L'efficacité des protéases peut donc être en raison de leur large spectre d'activité en dégradant une variété de protéines qui agissent en partie en tant que composants structuraux multiples des EPS. Des protéines extracellulaires sécrétées sont des substances ayant un poids moléculaire compris entre 10 et 200 kDa. Ces composés contiennent 40 - 60% d'acides aminés hydrophobes. Il a été observé que les protéines extracellulaires synthétisées par *Sulfolobus acidocaldarius* sont composées principalement d'acides aminés avec un groupe hydroxyle. Cependant, la couche extracellulaire protéique de *Bacillus subtilis* est une composition de résidus de L et D glutaminosyl (Czaczyk et Myszka, 2007). Selon Ton-That et al. (2004), le rapport des isomères du glutaminosyl dans *Bacillus subtilis* dans la couche de protéine extracellulaire est changé de manière significative dans des conditions limitées en oxygène. Leroy et al. (2007) ont également trouvé que la protéase Savinase est plus efficace pour la prévention de l'adhésion et de détachement d'un biofilm de *Pseudoalteromonas sp* D14 que xylanase, amylase, cellulase et lipase. Ledder et al. (2008) ont également trouvé que la protéase est efficace pour l'élimination de biofilms de *A. naeslundii* et *F. nucleatum*. Donlan et Costerton (2002) ont indiqué que les EPS peuvent être hydrophiles ou hydrophobes selon les composants structuraux qui composent ces EPS et les conditions environnementales où les biofilms se développent. Des études ont indiqué que les composants des EPS des espèces bactériennes peuvent différer (Czaczyk et Myszka, 2007). La structure des polysaccharides synthétisés par les cellules microbiennes peut varier.

Les exopolysaccharides microbiens sont constitués soit de homopolysaccharides ou hétéropolysaccharides. Les homopolysaccharides sont composés d'un seul type monosaccharide tels que D- glucose ou le L- fructose (Czaczyk et Myszka, 2007). Les homopolysaccharides appartiennent à trois groupes distincts, notamment : - D - glucane qui est produite par *Leuconostoc mesenteroides*; β -D- glucane qui est produite par *Pediococcus spp.* et *Streptococcus spp.* ; Fructanes sont produites par *Streptococcus salivarius*. Un certain nombre de bactéries lactiques produisent des hétéropolysaccharides. Ces molécules forment des unités répétées de monosaccharides comprenant le D- glucose, D- galactose, L- fructose, L- rhamnose, acide D- glucuronique, l'acide L-guluronique et de l'acide D-mannuronique. Le type de liens entre les deux unités monosaccharides et la ramification de la chaîne détermine les propriétés physiques des hétéropolysaccharides microbiens (Sutherland, 2001 ; Czaczyk et Myszka, 2007). A titre d'exemple, l'alginate bactérien est un hétéropolysaccharide ayant une structure irrégulière. Dans ce polymère, les résidus de D- mannosyl et L- guluronosyl, sont trouvés. L'alginate est principalement produite par les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* et *Azotobacter vinelandii* (Czaczyk et Myszka, 2007). En raison d'un large éventail de liens et de la complexité structurale des polysaccharides, il serait donc difficile pour la plupart des enzymes glycosidases de briser les liens de liaison des monomères constituant les polysaccharides qui déterminent la structure physique de l'EPS. Molobela et al. (2010) ont montré que les enzymes amylases testées pour la dégradation d'un biofilm de *P. fluorescens*, étaient moins efficaces que les protéases. Ceci est également en accord avec des études antérieures, ce qui indique que l'activité de la plupart des enzymes amylases testées était moins efficace pour l'élimination des biofilms bactériens que les protéases (Ledder et al, 2008). Cela a été attribué à la dominance de protéines dans les EPS. Dans la plupart des cas, les protéines semblent être les principaux constituants des EPS de biofilms et se trouvent principalement à la couche externe des biofilms (Liu et al, 2004 ; Bhaskar et Bhosle, 2005).

Parmi les glycosidases, les glucanases et les cellulases semblent les plus efficaces dans cette présente étude. Cependant, le potentiel anti-biofilm et anti-adhésion de ces enzymes pourrait suggérer la présence de glucanes ou de glucoses liés en position β - au sein de la matrice des biofilms modèles. De même, parmi les protéases, la papaïne, la subtilisine et la trypsine semblent les plus efficaces. Des études ont montré que la protéase papaïne pouvait hydrolyser un polysaccharide comme le chitosane (Vishu Kumar et al, 2004). Il est donc impossible de déterminer la nature des EPS du biofilm en fonction des différentes activités enzymatiques à l'origine du potentiel anti-adhésion et anti-biofilm. Ces derniers pourraient être liés au large

spectre d'activité des préparations enzymatiques étudiées. Pour connaître la nature des EPS une étude plus approfondie sur les EPS produits par les bactéries modèles utilisées dans cette étude sera réalisée dans le chapitre 6.

2.3.2 Efficacité des enzymes et adsorption

Le potentiel préventif des enzymes pourrait également s'expliquer par le simple fait qu'elles s'adsorbent sur la surface. L'adsorption de protéines ou de sucres sur une surface induit un changement des propriétés physicochimiques de la surface (Schakenraad et Busscher, 1989) interférant dans le phénomène d'adhésion des cellules (Fletcher, 1976 ; Bradshaw et al, 1997), surtout dans les tous premiers temps de l'adhésion (Rubio, 2002).

Leroy (2006) a montré que certaines enzymes ne sont plus du tout efficaces en prévention d'un biofilm de 24 heures par rapport à la prévention d'un biofilm de 3 heures (protéase Amano, Ultraflo, Shearzyme, Celluclast, Cellulyve, Pectinase et les lipases). Elle a expliqué ce résultat par une perte de stabilité enzymatique dans le milieu réactionnel au cours du temps, mais plus probablement par le fait que le phénomène d'inhibition observé en prévention d'un biofilm de 3 heures ne serait pas lié à l'activité enzymatique propre de la préparation mais au phénomène d'adsorption des enzymes ou des composés de la préparation enzymatique. Lorsque le taux d'inhibition préventif est constant ou augmenté avec le temps de formation du biofilm, c'est le cas pour Finizyme, Glucanex, Savinase et subtilisine, cela signifierait que le potentiel antisalissure est lié à l'activité enzymatique propre. Cette étude corrobore avec notre étude, puisqu'on a trouvé que l'efficacité des protéases et des glycosidases est plus important en lavage qu'en prévention, puisque l'enzyme est incubée au maximum 30 min en lavage au contraire en prévention où l'enzyme est incubée plusieurs heures avec la souche bactérienne testée qui s'explique par une perte de stabilité enzymatique dans le milieu réactionnel au cours du temps et par le phénomène d'adsorption des enzymes.

Par ailleurs, le manque d'efficacité de certaines enzymes pourrait être dû à une perte d'activité enzymatique liée à l'adsorption protéique sur la surface. En effet, certaines études montrent que les phénomènes d'adsorption peuvent entraîner un remaniement tridimensionnel de la protéine (Norde et Favier, 1992 ; Servagent-Noinville et al, 2000) induisant une perte de son activité enzymatique (Sosa, 1996).

Les conditions environnementales jouent un rôle très important dans le déclenchement de la dispersion des biofilms (Thormann et al, 2006). En effet, Les enzymes peuvent cibler à la fois

les molécules organiques adsorbées dans les tous premiers temps (film primaire), les molécules membranaires impliquées dans la phase d'adsorption initiale (type adhésines), les substances polymériques formées à la surface de la bactérie ou excrétées dans la matrice et les molécules organiques du quorum sensing, libérant ainsi des produits d'hydrolyses qui peuvent être des oses, polysaccharides, peptides, acides aminés, glycoprotéines, protéines, lipopolysaccharides... l'excès de l'ensemble de ces produits peuvent entraîner une dispersion massif de biofilm. Ces résultats corroborent avec ceux de Sauer et al., (2004) qui ont montré qu' une augmentation de la concentration en carbone, citrate, glutamate ou glucose, entraîne un détachement excessif de plus de 80% des cellules constituant le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Donc l'ensemble de ces résultats explique le potentiel préventif et curatif des différentes enzymes testées par le phénomène de dispersion des biofilms déclenché par l'excès des produits d'hydrolyses qui peuvent entraîner un détachement massif des cellules constituant le biofilm.

2.3.3 *Salmonella* spp S3349 : la souche en biofilm la plus résistante aux désinfectants la plus sensible aux enzymes

La salmonellose est la deuxième cause la plus fréquente des maladies d'origine alimentaire dans le monde entier. La contamination des surfaces dans les environnements de préparation des aliments peut induire la formation de biofilm, avec un risque de contamination des aliments. Les *Salmonelles* comme autres bactéries Gram négatifs, produisent des agrégats structurés ou biofilms, constitués d'une matrice essentiellement composée de polysaccharides complexes. Elles sont très adhérents aux surfaces et extraordinairement résistants aux désinfectants classiquement utilisés, et sont considérées comme un problème croissant dans les usines de transformation alimentaire et forment une source potentielle de contamination.

La décontamination efficace des surfaces affectées par le biofilm de *Salmonella* est difficile. Notamment, dans notre étude nous avons trouvé que le biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur l'inox présente une résistance extrême qui se manifeste par une activation et stimulation de formation de biofilm, plus que l'état normal c'est-à-dire en absence de désinfectants, à partir des concentrations sublétales qui sont inférieures à celles de la CMI et la CMB. Alors que l'activité anti-adhésion des quatre désinfectants analysés dans cette étude n'a pas dépassé 7%, tandis que l'activité anti-biofilm n'a pas dépassé 30% avec la plus forte concentration étudiée pour ces désinfectants. D'après nos études, il est clair que la résistance du biofilm aux désinfectants est un processus multifactoriel résultant de différents mécanismes et provoquant l'inefficacité des antimicrobiens, même à des concentrations

utilisables dans des solutions commerciales (Krolasik et al, 2010). Limiter l'adhésion des bactéries durant les phases de production, et faciliter leur décrochement pendant les phases de nettoyage constituent donc un réel enjeu industriel et sanitaire. De nouvelles stratégies de contrôle sont nécessaires pour surmonter ces limitations. Une autre considération est que les normes réglementaires est entrain de changer et certains désinfectants qui sont aujourd'hui standard seront probablement interdit pendant les prochaines années (Reach, la directive européenne sur les biocides, 98/8/CE). Il devient donc crucial de trouver des molécules alternatives dites «vertes» ou des procédés qui sont efficaces dans l'élimination de la contamination de surface. Effectivement, on s'est orienté dans notre étude vers la mise en évidence de certaines méthodes potentielles susceptibles d'améliorer les stratégies anti-adhésion et anti-biofilm. En effet, les procédés enzymatiques ont l'avantage de désagréger les amas de biofilm plutôt que de simplement les retirer de la surface, comme cela est le cas avec une action mécanique. Une façon possible d'utiliser des procédés enzymatiques pourrait promouvoir une dégradation naturelle de la matrice du biofilm. Nous avons choisi d'étudier l'efficacité de l'activité enzymatique des protéases et polysaccharidases pour répondre à la complexité de la matrice rigide qui protège le biofilm et qui est très résistante aux détergents classiquement utilisés. Leur utilisation en prévention comme en lavage permettrait d'éliminer les molécules organiques impliquées dans la formation, la cohésion et le développement des biofilms comme le film primaire présent dans les premières étapes de l'adhésion, les molécules membranaires de type adhésines, les EPS de la matrice extracellulaire ou les molécules signal du quorum sensing (QS). Dans nos travaux, nous avons démontré que les protéases testées ont présenté une grande efficacité avec un effet anti-adhésif contre le biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur l'inox de l'ordre de 84%. De même leur effet anti-biofilm a dépassé les 90%. Tandis que les polysaccharidases testés ont montré une efficacité anti-adhésion et anti-biofilm très important atteignant respectivement 90% et 94%. En effet, Les enzymes étudiées agissent spécifiquement sur les polymères qui constituent la structure du biofilm, les détruisent et parviennent à arracher le biofilm de sa surface. Dans notre étude on a pu montrer que le nettoyage du biofilm formé par *salmonella* spp S3349 sur un support en inox repose donc sur la désorganisation de la matrice complexe qui est très résistante aux désinfectants.

Malgré l'efficacité importante de ces enzymes sur le biofilm de *Salmonella* spp S3349, les enzymes toutes seules n'arrivent pas à décrocher complètement le biofilm de sa surface, et des traces de biofilm persistent mais à des très faibles pourcentages ce qui constitue une source de

contamination permanente. Pour cette raison il faut absolument désorganiser la matrice protégeant le biofilm pour permettre aux agents antimicrobiens d'arracher complètement le biofilm de sa surface. Une fois la matrice détruite, les bactéries libérées deviennent alors accessibles aux désinfectants. Donc cette étude prouve l'efficacité des enzymes en participant ainsi à l'amélioration de la qualité de désinfection afin d'arriver à l'élimination complète des biofilms.

2.4 Conclusion

Compte tenu de la résistance observée des biofilms aux désinfectants, les enzymes ont été prouvées dans cette étude très efficaces en permettant une dégradation naturelle de la matrice du biofilm participant ainsi à l'amélioration de la qualité de désinfection. Cette application des enzymes pourrait sans doute constituer donc un moyen abordable de bio-prévention et de bio-traitement des biofilms. D'ailleurs, les enzymes sélectionnées agissent spécifiquement sur les polymères qui constituent la structure du biofilm, les détruisent et parviennent à arracher le biofilm de sa surface. Une fois le biofilm décroché de sa surface, les antimicrobiens peuvent pleinement agir et assurer une hygiène optimale des surfaces.

Chapitre VI : Substances polymériques extracellulaires

Les sept bactéries modèles utilisées pour former le biofilm sur des supports différents introduits en microplaque ont été sélectionnées pour leurs fortes capacités d'adhésion et de formation de biofilm. La nature des EPS produites par des bactéries formant des biofilms est démontrée comme spécifique de la souche productrice. L'utilisation d'enzymes dans le but d'inhiber la formation de biofilms dans les trois secteurs étudiés repose sur l'hypothèse d'une hydrolyse des molécules organiques du biofilm. La connaissance de la nature des EPS produites par les sept bactéries modèles nous permettra d'étayer la discussion concernant une éventuelle relation entre la nature des enzymes qui permettent d'inhiber le biofilm et celle des EPS.

La composition de la matrice des biofilms est aujourd'hui mieux connue grâce notamment à des techniques récentes d'étude de biofilm in situ par observations microscopiques (confocale à balayage laser, électronique, épifluorescence) avec des marqueurs adaptés (lectines) (Neu et Lawrence, 1999a et b ; Strathmann et al, 2002 ; Kämper et al, 2004 ; Neu et al, 2004). Cependant, pour caractériser la nature des EPS, certaines analyses nécessitent de les purifier et de les extraire à partir de biofilms. Ce processus expérimental est complexe et les quantités d'EPS extraites nécessaires à une caractérisation biochimique sont limitées. C'est pourquoi la plupart des EPS caractérisées l'ont été à partir de monoculture de bactéries planctoniques et peu à partir de biofilms véritablement. Nous avons donc effectué une extraction des EPS produites par les sept bactéries modèles en fermentation sur la laine de verre ainsi qu'une analyse biochimique par méthodes colorimétriques afin de reconnaître la composition protéique et glucidique des EPS.

1. Croissance et cellules viables des sept bactéries étudiées

Au cours de la croissance des bactéries inoculées sur la laine de verre (utilisée comme support pour la formation de biofilm) en milieu nutritif, deux séries de cultures bactériennes ont été étudiées : une série quotidiennement nourrie avec 2 ml de bouillon nutritif marquée N et une autre série marquée J à jeun.

La figure 41 présente le suivi de la croissance bactérienne des sept souches étudiées à l'état nourris et à jeun. Alors que la détermination quantitative des cellules viable est présentée dans le tableau 12.

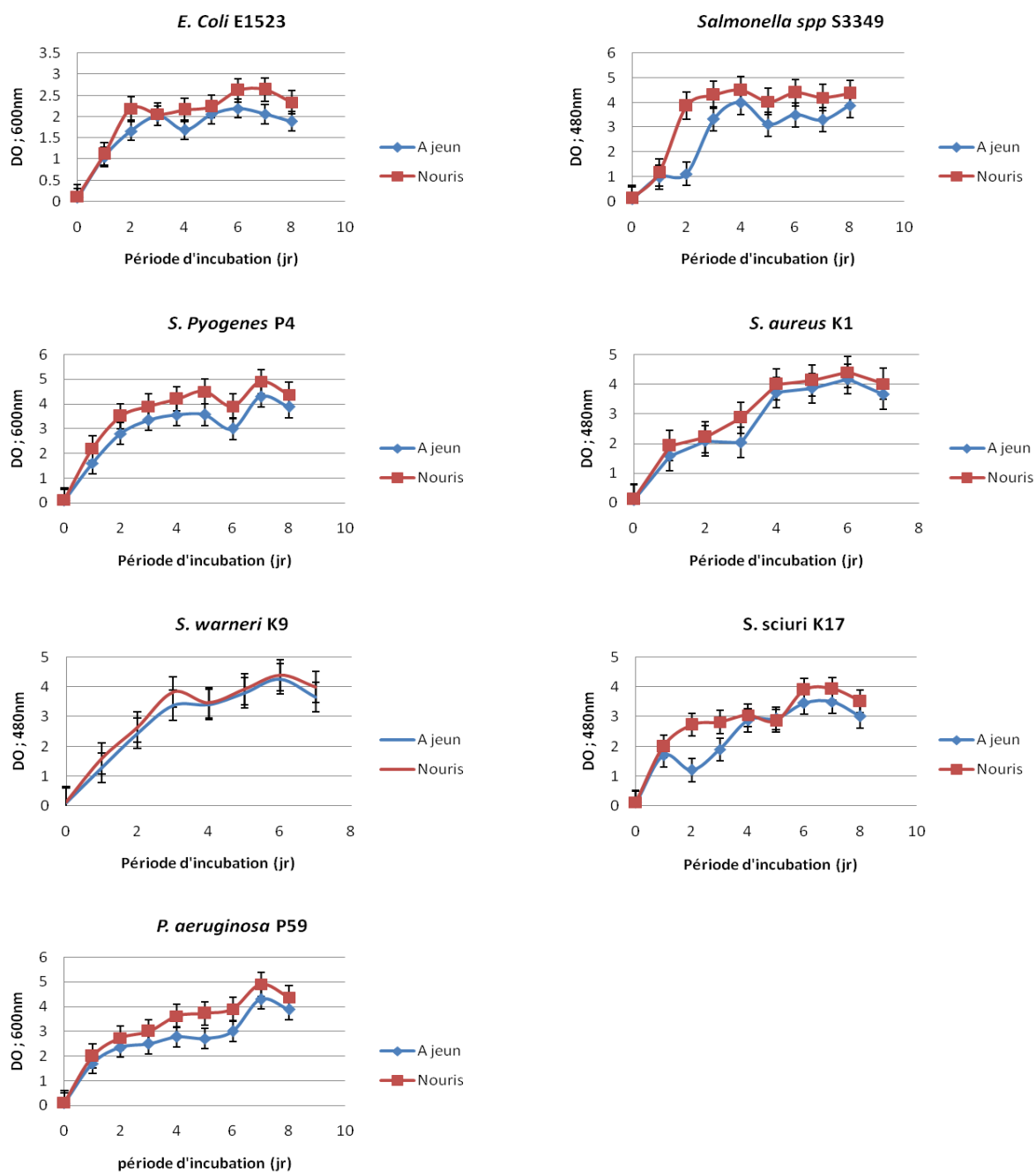


Figure 41 : La croissance de sept souches bactériennes (*E. coli* E1525, *Salmonella* spp S3349, *Staphylococcus warneri* K9, *Staphylococcus sciuri* K17, *Staphylococcus aureus* K1, *Streptococcus pyogènes* P4 et *P. aeruginosa* P59) dans des conditions de milieu nutritif nourris et à jeun.

Le taux de croissance des sept souches étudiées était maximal à partir du 6ème jour d'incubation et atteint progressivement une phase de plateau par la suite. La croissance dans le milieu alimenté quotidiennement (N) a été légèrement supérieure à celui à jeun (J) (Figure 41).

Tableau 12 : La comparaison des cellules viables entre le biofilm nourri et celui à jeun de sept bactéries pathogènes. * Moyenne \pm écart-type.

	Cellules viables (UFC.ml ⁻¹) Moyenne \pm ET *
<i>P. aeruginosa</i> P59	biofilm nourri: 78 10 ⁷ \pm 8.54
	biofilm à jeun: 51 10 ⁷ \pm 5.21
<i>E. Coli</i> E1523	biofilm nourri: 282 10 ⁷ \pm 7.11
	biofilm à jeun: 255 10 ⁷ \pm 3.95
<i>Salmonella</i> spp S3349	biofilm nourri: 61 10 ⁶ \pm 7.55
	biofilm à jeun: 48 10 ⁶ \pm 4.21
<i>S. aureus</i> K1	biofilm nourri: 200 10 ⁷ \pm 8.35
	biofilm à jeun: 168 10 ⁷ \pm 5.46
<i>S. pyogènes</i> P4	biofilm nourri: 277 10 ⁷ \pm 7.22
	biofilm à jeun: 249 10 ⁷ \pm 5.66
<i>S. sciuri</i> K17	biofilm nourri: 180 10 ⁷ \pm 5.61
	biofilm à jeun: 159 10 ⁷ \pm 6.21
<i>S. warneri</i> K9	biofilm nourri: 175 10 ⁷ \pm 4.6
	biofilm à jeun: 138 10 ⁷ \pm 6.22

L'analyse des résultats de comptage (des sept bactéries étudiées) présentés dans le tableau 12 ont montré que la concentration des cellules viables dans un milieu nourri alimenté quotidiennement est plus élevée que dans un milieu non alimenté.

2. Concentrations en EPS, en protéines et en carbohydrates

Les concentrations en EPS, en protéines et en carbohydrates extraites à partir de biofilms des sept bactéries modèles, sont représentées dans le tableau 13.

Tableau 13 : Comparaison de la production des exopolysaccharides (EPS), les concentrations de protéines et de glucides des biofilms nourris et ceux à jeun de sept bactéries pathogènes.

* Moyenne \pm écart-type.

	Biofilms nourri (My \pm ET)*			Biofilms à jeun (My \pm ET)*		
	EPS mg/ml	Protéine μ g/ml	carbohydrate μ g/ml	EPS mg/ml	Protéine μ g/ml	carbohydrate μ g/ml
<i>P. aeruginosa</i> P59	1.57 \pm 0.02	383.9 \pm 0.21	65.31 \pm 0.055	1.37 \pm 0.015	212.9 \pm 1.2	50.67 \pm 0.87
<i>E. coli</i> E1523	1.75 \pm 0.008	219.4 \pm 0.1	45.97 \pm 0.4	1.51 \pm 0.01	151.6 \pm 0.02	41.77 \pm 0.21
<i>Salmonella</i> spp S3349	1.92 \pm 0.01	474.2 \pm 0.19	74.48 \pm 0.14	1.61 \pm 0.019	422.6 \pm 1.22	54.49 \pm 0.45
<i>S. pyogènes</i> P4	2.1 \pm 0.09	374.2 \pm 1.31	96.836 \pm 1.5	1.78 \pm 0.019	245.2 \pm 0.58	71.501 \pm 0.64
<i>S. aureus</i> K1	1.67 \pm 0.03	322.6 \pm 1.1	33.77 \pm 1.21	1.22 \pm 0.02	164.5 \pm 1.15	23.08 \pm 0.02
<i>S. sciuri</i> K17	1.6 \pm 0.02	322 \pm 0.97	32 \pm 1.01	1.11 \pm 0.01	163.5 \pm 0.5	22.1 \pm 1.18
<i>S. warneri</i> K9	1.63 \pm 0.018	322.4 \pm 1.54	33 \pm 1.99	1.18 \pm 0.015	164 \pm 1.94	22.77 \pm 1.58

La concentration des substances polymères extracellulaires (EPS) des biofilms des sept bactéries analysées qui ont été alimentés quotidiennement était plus élevée que la concentration des EPS dans les biofilms à jeun (Tableau 13). La concentration en protéines dans les deux expériences était plus élevée que la concentration des carbohydrates. Cependant, les concentrations en protéines dans les EPS de biofilms cultivés avec alimentation par jour étaient plus élevées que les concentrations en protéines dans l'EPS de biofilms à jeun. De même, les concentrations en glucides étaient plus élevées dans les EPS de biofilms nourris quotidiennement que dans les EPS de ceux à jeun (tableau 13).

3. Discussion

3.1. L'effet de la concentration des nutriments sur le rendement de biofilm

Il y avait une différence dans la croissance microbienne entre le milieu nutritif en conditions nourries et à jeun comme il y avait une différence notable entre les cellules viables de biofilms cultivés dans un milieu nourri et à jeun, mais il y avait aussi une différence dans la quantité d'EPS produit. Les biofilms nourris produisent plus d'EPS que les biofilms à jeun. En effet, les nutriments stimulent les cellules de biofilms croissants dans un milieu riche de produire plus d'EPS. Il a été indiqué dans des études précédentes que la croissance des biofilms en milieu riche en éléments nutritifs étaient plus abondants, dense et plus épaisse (Allison et al, 2000 ; Prakash et al, 2003 ; Rochex et Lebeault, 2007). Rochex et Lebeault (2007) ont montré que les conditions nutritives influencent la formation de biofilms de souches bactériennes isolées à partir d'une machine à papier. Rochex et Lebeault (2007) ont également comparé les biofilms qui poussent dans deux concentrations moyennes différentes de glucose et ont constaté que la masse de biofilm dans un milieu contenant 0,1 g / l de glucose était de 90% inférieure à la masse de biofilm dans un milieu contenant 0,5 g / l de glucose.

3.2. Les concentrations de protéines et de glucides dans les EPS de biofilm

Les EPS des biofilms cultivées dans un milieu nourri ont une concentration de protéines et de glucides plus élevée que les EPS des biofilm à jeun. Alors que les concentrations en protéines ont été plus élevées que les concentrations en hydrates de carbone dans les EPS des deux biofilms nourris et à jeun. Ceci indique que les composants structurels des EPS de biofilm sont dépendants de l'état nutritif dans lequel le biofilm a été cultivé. Ces résultats concordent aux travaux de Simoes et al. (2003) qui ont trouvé plus de protéines (protéine totale = 217,7 mg/g) que d'hydrates de carbone (glucides totaux = 63,3 mg/g) dans les EPS de biofilms produits par *P. fluorescens* dans des conditions de croissance spécifiques.

Dans certaines études, il a été indiqué que les glucides sont les principaux constituants des EPS alors que certaines autres ont trouvé que les protéines sont dominants (Zhang et Fang, 2001 ; Liu et Fang, 2002 ; Orgaz et al, 2006). Dans cette étude, les protéines ont été jugées dominant plutôt que les hydrates de carbone. Néanmoins, la composition des EPS de biofilms diffère par la quantité; la structure et la nature en fonction des microorganismes formant le

biofilm. Les composants structurels de l'EPS dépendent du type de microorganismes à l'intérieur du biofilm. Allison et al. (2000) ont indiqué que les EPS des biofilms sont très hétérogènes, même parmi les mêmes espèces bactériennes et donc leur composition et leur fonction dans les biofilms seront différentes. O'Toole et al. (2000) ont indiqué que différents biofilms produisent différentes quantités d'EPS. En outre, selon les protocoles d'extraction utilisés, la composition d'EPS sera différente (Liu et Fang, 2002 ; Augustin et al, 2004). Liu et Fang (2002) ont étudié des cultures mixtes dans des systèmes de traitement des eaux usées et ont trouvé que la concentration en protéine (41,3%) était supérieure à la concentration en hydrates de carbone (18,7%) dans la boue méthanogène lorsque le procédé d'extraction formaldéhyde-NaOH a été appliqué. En outre, le processus d'extraction avec le formaldéhyde-NaOH extrait la concentration la plus élevée d'EPS de toutes les boues.

Dans cette étude, les EPS de biofilms ont été extraite par centrifugation de l'échantillon à haute et basse vitesse pour séparer la biomasse des EPS. Cette méthode a été choisie en raison de son efficacité d'extraction supérieure et des lyses cellulaires inférieurs. Ensuite, les dosages de Lowry et d'Anthrone ont été utilisés pour la quantification des concentrations de glucides et de protéines respectivement dans les EPS. Les dosages d'Anthrone et de Lowry ont été utilisés dans cette étude pour la quantification de protéines et de glucides totaux dans les EPS. Ces dosages sont basés sur la détermination colorimétrique de développement de la couleur. L'avantage est que ces dosages peuvent également être effectués en microplaque et peuvent être effectués à température ambiante. En outre des courbes standard peuvent être construites de manière à convertir les absorptions en concentration.

Limitée par les problèmes quantitatifs d'extraction et de purification des EPS produits au sein des biofilms, la majeure partie des études concernant la nature des EPS issues de bactéries est effectuée sur des EPS produites en milieu de culture en fermenteurs (Nielsen et Jahn, 1999). Une étude biochimique comparative entre des EPS solubles et non solubles issues d'une fermentation et une fraction d'EPS issue du biofilm a été réalisée montrant une forte homologie des spectres IR des EPS mais aussi une augmentation de la conformation en hélice β de l'exopolymère soluble (Beech et al, 1999). Costerton et al. (1981) utilisent des anticorps ciblés contre les exopolymères de cellules planctoniques pour révéler des interactions avec le biofilm (Costerton et al, 1981). Les EPS produites en fermenteurs ne seraient pas de nature différente de celles produites au sein du biofilm. Cependant, en fonction des conditions du milieu de production des EPS (fermentation ou biofilm), les conformations des protéines ou des sucres ainsi que leurs substitutions, ou les quantités produites peuvent être différentes.

Par ailleurs, le potentiel anti-biofilm des enzymes semble être corrélé avec les observations issues de la caractérisation biochimique des EPS sauf pour le biofilm de *Salmonella* spp S3349 et *P. aeruginosa* P59. En effet, on a vu dans le chapitre précédent que l'effet des protéases apparaît supérieur à celui des glycosidases en prévention comme en lavage pour les trois souches de *Staphylococcus* (*aureus*, *sciuri* et *warneri*). Alors que pour *P. aeruginosa* P59 et *Salmonella* spp S3349, l'effet des glycosidases semble supérieur à celui des protéases en prévention comme en lavage. Tandis que pour *E. coli* E1525 et *Streptococcus pyogènes* P4, l'effet des glycosidases apparaît supérieur à celui des protéases en prévention, or en lavage il semble que les protéases présentent une efficacité ayant une tendance à augmenter par rapport à la prévention d'un biofilm.

D'ailleurs, l'efficacité anti-biofilm des protéases supérieure à celle des glycosidases est corrélée avec la forte présence de protéines au sein des EPS du biofilm traité. Tandis que l'efficacité anti-adhésion de ces protéases supérieures aux glycosidases suggère à la fois une forte implication des protéines dans les phénomènes de l'adhésion, et aussi des EPS non solubles ou capsulaires (Sutherland, 2001). Alors que, l'efficacité anti-adhésion importante des glycosidases par rapport aux protéases observée contre le biofilm de quelques souches serait donc liée à la composition d'extrême surface des bactéries étudiées, avant qu'elles ne produisent la matrice extracellulaire du biofilm, suggérant que ces enzymes agiraient directement sur les molécules de surface des bactéries et permettraient davantage de perturber la matrice du biofilm en formation. Cependant, certaines études ont montré que les bactéries en suspension étaient phénotypiquement différentes de bactéries en biofilm, l'adhésion entraînant l'inactivation de certains gènes et l'activation d'autres, comme chez *Pseudomonas aeruginosa* où le gène de la synthèse d'alginate est sur exprimée suite à l'adhésion (Davies et al, 1993). Branda et al. (2005) pensent qu'une même souche de bactérie pourrait produire plusieurs et différents polysaccharides extracellulaires selon qu'elle est en biofilm ou non. Au contraire, Sutherland (2001) pense que certaines EPS du biofilm possèdent la même composition que celle issues de bactéries planctoniques.

En effet, sachant que la composition protéique des EPS est plus importante que celle glucidique, l'efficacité anti-biofilm importante des glycosidases par rapport aux protéases observée par exemple contre le biofilm de *P. aeruginosa* P59, suggère la présence des sites de compatibilités de ces glycosidases dans la matrice d'exopolysaccharides protégeant le biofilm de cette souche. Donc, on peut suggérer qu'il est impossible de déterminer la nature des EPS du biofilm en fonction des différentes activités enzymatiques à l'origine du potentiel anti-

adhésion et anti-biofilm. Ces derniers pourraient être liés au large spectre d'activité des préparations enzymatiques étudiées. Pour connaître la nature et la composition des EPS une étude plus approfondie sur les EPS produites dans le biofilm doit être toujours réalisée.

4. Conclusion

Dans ce travail, les protéines ont été jugées dominantes plutôt que les glucides. D'après notre étude, on peut suggérer qu'il est impossible de déterminer la nature des EPS du biofilm en fonction des différentes activités enzymatiques à l'origine du potentiel anti-adhésion et anti-biofilm. Pour connaître la nature et la composition des EPS une étude plus approfondie sur les EPS produits dans le biofilm doit être toujours réalisée afin d'inventer un détergent enzymatique le plus adéquat contre le biofilm cible.

Discussion et Conclusions générales

La formation de biofilms est un phénomène commun à la majorité des matériaux exposés à une certaine humidité et contaminés par des microorganismes. Nous avons mis au point un test modèle adapté aux milieux industriel, médical et environnemental permettant ainsi de cribler le potentiel de préparations désinfectantes et enzymatiques à prévenir la formation ou éliminer de biofilms. Sept bactéries modèles ont été choisies pour leur forte adhésion en représentant les secteurs les plus touchés : Le secteur agroalimentaire présenté par *Escherichia coli* E1525 développée sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 développée sur des billes d'inox ; le secteur médical présenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 développées sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4 développées sur des coupons de cathéter ; le secteur environnemental présenté par *Pseudomonas aeruginosa* P59 développée sur des coupons cylindriques de polyéthylène. Les différents supports ont été introduits en microplaques de polystyrène. Le test développé permet également de vérifier la toxicité des préparations désinfectantes et enzymatiques sur les cellules non adhérentes par déterminations de CMI et CMB de ces produits testés, montrant ainsi que la non adhésion des bactéries n'est pas liée à un effet toxique de l'enzyme, puisqu'on a trouvé que toutes les enzymes étudiées ne sont pas bactéricides par les concentrations analysées. En effet, chaque enzyme et désinfectant testés présentent une CMI spécifique selon la souche étudiée. Tous les désinfectants testés ont été bactéricides vis-à-vis de quelques souches bactériennes, cette bactéricidie n'a pas inhibé l'adhésion bactérienne en formant ainsi le biofilm.

Nous avons donc montré, au cours de ces différentes études, que la sensibilité des bactéries testées à la bactéricidie de certains produits désinfectants à l'état planctonique n'a pas inhibée la synthèse de biofilm qui constitue pour elle une méthode d'échappement et de défense aux conditions hostiles (la bactéricidie des désinfectants). En effet, à l'état planctonique aucune croissance bactérienne n'est apparente pour la CMB, tandis que l'analyse de biofilm pour la même concentration, et même pour des concentrations supérieures à la CMB, nous a permis de trouver qu'il y a un certain pourcentage de formation de biofilm. Dans ce cas, la bactérie présente deux phénotypes pour la même concentration (\geq CMB) : bactérie absente (morte) à l'état planctonique, alors qu'elle est présente en biofilm où elle entre dans une phase de latence qui présente pour cette bactérie une forme de persistance et de subsistance. Et par conséquent, on peut suggérer que les changements induits par l'adhésion cellulaire peuvent conduire à l'apparition de plusieurs phénotypes de résistance à

l'état biofilm. Alors que d'autres désinfectants par des concentrations sublétales ont été trouvés stimulateurs de formations de biofilms de quelques bactéries (*Salmonella* spp S3349 développée sur l'inox, *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogenes* P4 développées sur le cathéter). Notamment, dans le cas de *Salmonella* spp S3349, on a trouvé une stimulation de formation de biofilm à partir des concentrations inférieures à 1/32 des quatre désinfectants testés. Donc nous pouvons suggérer que les cellules en biofilm affichent une meilleure adaptation aux désinfectants que leurs homologues planctoniques après une exposition continue par la régulation positive des protéines spécifiques impliquées dans le métabolisme de l'énergie, la biosynthèse des protéines, l'adaptation des protéines et la désintoxication, avec un changement dans la composition en acides gras, en suggérant que l'adaptation spécifique en biofilm confère une meilleure survie de la population de biofilm adapté.

D'ailleurs, les souches modèles étudiées en biofilms ont présenté une certaine résistance contre les désinfectants étudiés par rapport aux enzymes. Cette résistance aux désinfectants dépend de la souche étudiée et de la composition de chaque désinfectant. Le désinfectant P4 a été plus efficace en présentant des effets préventif et curatif les plus importants contre les biofilms étudiés par rapport aux autres désinfectants, puisqu'il combine entre trois principes actifs qui sont l'alcool, l'ammonium quaternaire et le biguanide. *S. sciuri* K17 et *S. warneri* K9 ont été les souches les plus sensibles en biofilm à l'action curative et préventive des quatre désinfectants étudiés, avec un maximum d'effet anti-adhésion qui a dépassé les 90% et un maximum d'efficacité anti-biofilm qui a atteint 80%. Tandis que, *Salmonella* spp S3349 a été la souche la plus résistante en biofilm aux désinfectants la plus sensible à l'action des enzymes. L'activité anti-adhésion des quatre désinfectants analysés dans cette étude contre le biofilm de *Salmonella* spp S3349 n'a pas dépassé 7%, tandis que l'activité anti-biofilm n'a pas dépassé 30% avec la plus forte concentration étudiée pour ces désinfectants. Ces résultats obtenus ont permis de formuler l'hypothèse que les persistants se développent plus fréquemment dans un biofilm que dans une culture planctonique, peuvent être induites par les conditions environnementales spécifiques qui prévalent au sein de la structure, et peuvent donc contribuer à une meilleure protection antimicrobienne dans le biofilm.

Le niveau des taux d'inhibition en fonction de la concentration en enzyme est une courbe sigmoïde de type dose-réponse pour certaines enzymes et une courbe sous forme de plateau qui atteint rapidement un maximum d'efficacité pour d'autres enzymes. Selon la

classe des enzymes testées et selon la souche étudiée, des niveaux d'efficacité différents ont été observés. Les protéases se sont révélées plus efficaces que les glycosidases en prévention comme en lavage pour les trois souches de *Staphylococcus* (*aureus*, *sciuri* et *warneri*). Alors que pour *P. aeruginosa* P59 et *Salmonella* spp S3349, les glycosidases se sont démontrées plus efficaces que les protéases en prévention comme en lavage. Tandis que pour *E. coli* E1525 et *Streptococcus pyogènes* P4, les glycosidases se sont révélées plus efficaces que les protéases en prévention, or en lavage il semble que les protéases présentent une efficacité ayant une tendance à augmenter par rapport à la prévention d'un biofilm. Si on étudie le type d'activités glycosidases, en regard des pourcentages d'efficacité maximales atteintes, il semblerait que la β -glucanase et la cellulase soient plus efficaces que la xylanase et la pectinase. Et si on étudie le type d'activités protéases, en regard des pourcentages d'efficacité maximales atteintes, il semblerait que la trypsine, la subtilisine et la papaïne soient les plus efficaces. D'une manière générale, les protéases et les glycosidases ont présenté une efficacité, ayant une tendance à augmenter en lavage, par rapport à la prévention d'un biofilm.

La résistance de biofilms aux désinfectants de plusieurs souches et notamment de *Salmonella* spp S3349 est un processus multifactoriel résultant de différents mécanismes et provoquant l'inefficacité des antimicrobiens, même à des concentrations utilisables dans des solutions commerciales. Dans nos travaux, nous avons démontré que les protéases testées ont présenté une grande efficacité avec un effet anti-adhésion contre le biofilm de *Salmonella* spp S3349 développé sur l'innox de l'ordre de 84%. De même leur effet anti-biofilm a dépassé les 90%. Tandis que les polysaccharidases testés ont montré une efficacité anti-adhésion et anti-biofilm très important atteignant respectivement 90% et 94%. Donc l'utilisation des procédés enzymatiques pourrait promouvoir une dégradation naturelle de la matrice du biofilm.

Concernant ces mécanismes impliqués dans l'inhibition de la formation et du développement du biofilm par les enzymes, plusieurs hypothèses sont envisageables. Les molécules organiques cibles des enzymes peuvent être à la fois les molécules organiques adsorbées dans les tous premiers temps (film primaire), les molécules membranaires impliquées dans la phase d'adsorption initiale (type adhésines), les substances polymériques formées à la surface de la bactérie ou excrétées dans la matrice et les molécules organiques du quorum sensing. Des études sur les substances polymériques produites par les sept bactéries modèles en fermenteur en formant de biofilms sur la laine de verre utilisée comme support

d'adhésion ont été réalisées. Or, deux séries de cultures bactériennes ont été étudiées : une série quotidiennement nourrie avec 2 ml de bouillon nutritif et une autre à jeun. Ces études ont révélé une différence dans la croissance microbienne entre le milieu nutritif en conditions nourris et à jeun, et une différence notable dans les cellules viables de biofilms cultivés dans un milieu nourris et celui à jeun ainsi qu'une différence dans la quantité d'EPS produite. Les biofilms nourris produisent plus d'EPS que les biofilms à jeun. En effet, les nutriments stimulent les cellules de biofilms croissants dans un milieu riche de produire plus d'EPS. Nous avons également révélé une présence majoritaire de protéines par rapport aux carbohydrates. Donc le potentiel anti-biofilm des enzymes semble corrélér aux observations issues de la caractérisation biochimique des EPS sauf pour le biofilm de *Salmonella* spp S3349 et *P. aeruginosa* P59.

D'ailleurs l'efficacité anti-biofilm importante des protéases supérieures aux glycosidases est corrélée avec la forte présence de protéines au sein des EPS du biofilm traité. Tandis que l'efficacité anti-adhésion de ces protéases supérieures aux glycosidases suggère à la fois une forte implication des protéines dans les phénomènes de l'adhésion, et aussi des EPS capsulaires. Alors que, l'efficacité anti-adhésion importante des glycosidases par rapport aux protéases observée contre le biofilm de quelques souches serait donc liée à la composition d'extrême surface des bactéries étudiées, avant qu'elles ne produisent la matrice extracellulaire du biofilm, suggérant que ces enzymes agiraient directement sur les molécules de surface des bactéries et permettraient de perturber davantage la matrice du biofilm en formation. En effet, malgré que la composition protéique des EPS soit plus importante que celle glucidique, l'efficacité anti-biofilm importante des glycosidases par rapport aux protéases observée par exemple contre le biofilm de *P. aeruginosa* P59, suggère la présence des sites de compatibilités de ces glycosidases dans la matrice d'exopolysaccharides protégeant le biofilm de cette souche. Donc on peut suggérer qu'il est impossible de déterminer la nature des EPS du biofilm en fonction des différentes activités enzymatiques à l'origine du potentiel anti-adhésion et anti-biofilm. Ces derniers pourraient être liés au large spectre d'activité des préparations enzymatiques étudiées. Pour connaître la nature et la composition des EPS une étude plus approfondie sur les EPS que ce soit capsulaires ou bien produites dans le biofilm doit être toujours réalisée, afin d'inventer un détergent enzymatique le plus adéquat contre le biofilm cible.

Nous avons démontré le potentiel anti-biofilm et anti-adhésion de certaines préparations enzymatiques et désinfectantes en solution dans les conditions de laboratoire.

Nous avons également montré que l'activité enzymatique est très intéressante, par rapport aux désinfectants, surtout pour les souches qui présentent une résistance accrue contre les désinfectants testés, notamment le cas de *Salmonella* spp S3349. Pourtant que les normes réglementaires sont entrain de changer et certains désinfectants qui sont aujourd'hui standard seront probablement interdits pendant les prochaines années (Reach, la directive européenne sur les biocides, 98/8/CE). Il devient donc crucial de trouver des molécules alternatives dites «vertes» ou des procédés qui sont efficaces dans l'élimination de la contamination de surface. D'après notre étude, et face aux problèmes liés à la résistance du biofilm aux désinfectants, l'utilisation des procédés enzymatiques pourrait donc promouvoir une dégradation naturelle de la matrice du biofilm en constituant un moyen abordable de bio-prévention et de bio-traitement des biofilms en améliorant ainsi la qualité de désinfection. D'ailleurs, les enzymes sélectionnées agissent spécifiquement sur les polymères qui constituent la structure du biofilm, les détruisent et parviennent à arracher le biofilm de sa surface. Une fois le biofilm décroché de sa surface, les antimicrobiens peuvent pleinement agir et assurer une hygiène optimale de la surface. Enfin les différents résultats issus de ce travail de thèse pourront être d'utilité dans les trois secteurs concernés par les phénomènes de bioadhésion (industrie agroalimentaire, domaine médicale et environnemental...) en participant ainsi à la maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau potable et des aliments, la maîtrise aussi de la qualité d'hospitalisation et des soins médicaux. Comme ils auront nécessairement des retombées socio-économiques positives, que ce soit au niveau de la mise en conformité vis-à-vis de la réglementation ou de la protection de la santé publique.

Perspectives

Ce travail de thèse a permis d'apporter de nouveaux outils de travail pour mettre au point un test modèle adapté aux milieux industriel, médical et environnemental permettant ainsi de cribler le potentiel de préparations désinfectantes et enzymatiques à prévenir la formation ou éliminer de biofilms. Il a également permis de prouver l'activité enzymatique très intéressante en promouvant une dégradation naturelle de la matrice du biofilm en constituant un moyen abordable de bio-prévention et de bio-traitement des biofilms en améliorant ainsi la qualité de désinfection. Pareillement, il a permis, par la connaissance de la composition protéique et glucidique des EPS produites par les sept bactéries modèles, d'étayer la discussion concernant une éventuelle relation entre la nature d'enzymes qui permettent d'inhiber le biofilm et celle des EPS. Suite aux nombreux résultats exposés dans ce manuscrit, de nouvelles questions se sont naturellement posées, permettant l'introduction d'approches originales qui pourront être abordées durant les prochaines années.

L'avantage des études microscopiques AFM et MEB de nos échantillons n'a pas encore été exploité dans le cadre de notre thèse. Le développement de ces techniques demeure un défi majeur pour la compréhension des mécanismes impliqués et pourrait compléter utilement nos résultats expérimentaux. Ainsi, une étude spectroscopique plus approfondie sur les EPS que ce soit capsulaires ou bien produits dans le biofilm doit être réalisée pour connaître la nature et la composition des EPS, afin d'inventer un détergent enzymatique le plus adéquat contre le biofilm cible.

En effet, quoique les procédés qui dénaturent l'intégrité des EPS soient conçus pour disperser la majeure partie de la contamination de surface ils ne sont généralement pas efficaces pour éliminer complètement le biofilm et des traces de biofilm persistent à des très faibles pourcentages. Les agents pathogènes peuvent éventuellement être redéposés ailleurs et lancer un nouveau cycle de biofilm, soulignant ainsi l'importance des stratégies complémentaires antimicrobiennes. Afin de satisfaire notre volonté permanente à exploiter de nouveaux agents antimicrobiens anti-adhésion et anti-biofilm potentiellement très efficaces, cette étude doit être achevée en ayant comme perspectives l'invention d'un détergent enzymatique. Il serait d'ailleurs très intéressant d'étudier l'activité enzymatique en association entre les enzymes les plus efficaces et/ou en présence de détergents comme le désinfectant P4 afin d'observer une éventuelle synergie. D'ailleurs, les enzymes sélectionnées vont agir spécifiquement sur les polymères qui constituent la structure du biofilm, les détruisent et

parviennent à arracher le biofilm de sa surface. Une fois la matrice détruite, les bactéries libérées deviennent alors accessibles aux désinfectants en assurant une hygiène optimale de la surface.

La perspective d'utilisation des enzymes en tant qu'agent anti-adhésion et anti-biofilm sera de les incorporer dans des peintures anti-biofilm, via la mise au point de méthode d'encapsulation d'enzymes afin qu'elles puissent garder leur activité enzymatique au sein de la matrice ; ou de les greffer directement sur des alliages métalliques ou polymères.

En perspective aussi, il serait très intéressant d'étudier l'application d'enzymes en circuits de refroidissement, en circuits d'appareils d'hémodialyse, et en circuits des réseaux de distribution d'eau potable..., pourrait se faire par injection directe de solutions enzymatiques en discontinu. L'injection d'enzymes dans ces circuits permettrait de diminuer l'utilisation de produits biocides, utilisée comme un remède abordable de lavage des circuits. Il sera cependant nécessaire d'injecter des doses d'enzyme suffisantes pour être efficaces mais non polluantes et à un coût abordable.

Références

- Allegrucci, M., Sauer, K., 2007. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Streptococcus pneumoniae* Biofilms. *J. Bacteriol.* 189, 2030–2038.
- Allion, A., 2004. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.
- Allison, D.G., 2003. The biofilm matrix. *Biofouling* 19, 139–150.
- Allison, D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M., Wilson, M. (Eds.), 2000. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press, Cambridge.
- Allison, D.G., Sutherland, I.W., 1987. The Role of Exopolysaccharides in Adhesion of Freshwater Bacteria. *Microbiology* 133, 1319–1327.
- Allison, G.W., Lubchenco, J., Carr, M.H., 1998. Marine Reserves are Necessary but not Sufficient for Marine Conservation. *Ecological Applications* 8, S79–S92.
- Amiyare, R., Esmail, A., Ghanmi, Y., Ouhsin, M., 2015. Evaluation of the effect of a disinfectant based on Glutaraldehyde 2% on *Acinetobacter baumannii* biofilm. *J. Mater. Environ. Sci.* 6, 3168-3173.
- Ando, T., Itakura, S., Uchii, K., Sobue, R., Maeda, S., 2009. Horizontal transfer of non-conjugative plasmid in colony biofilm of *Escherichia coli* on food-based media. *World J Microbiol Biotechnol* 25, 1865–1869.
- Arantxa, C.E., 2014. Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de biofilm à l'interface eau-composés organiques hydrophobes. École doctorale Sciences exactes et leurs applications. UFR Sciences et Techniques .
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., Atroshi, F., 2004. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *J Pharm Pharm Sci* 7, 55–64.
- Aunstrup, K., Andresen, O., Outtrup, H., 1972. Preparation of proteolytic enzymes having maximum activity at high alkalinity. US3674643 A.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., Gram, L., 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 239–250.
- Baier, R.E., 1972. Organic films on natural waters: Their retrieval, identification, and modes of elimination. *J. Geophys. Res.* 77, 5062–5075.
- Baldrige, J.W., Michalow, A., 2004. Reduction du film biologique dans les systemes de filtration a flux tangentiel. WO2003022752 A9.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ouedrhiri, W., Farah, A., Elabed, S., Ibsouda, S. K., 2014. Antibacterial activity of extracts from *salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* obtained by sonication and maceration methods. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 167–170.
- Barberousse, H., Lombardo, R.J., Tell, G., Couté, A., 2006. Factors involved in the colonisation of building façades by algae and *Cyanobacteria* in France. *Biofouling* 22, 69–77.
- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Laglaoui, A., 2016. Antibacterial and anti-biofilm Effects of three species of *Mentha*: *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* and *Mentha piperita*. *Phytothérapie* 14, 88–96.
- Barkai, H., Elabed, S., Sadiki, M., Ibsouda, S. K., 2016. Antifungal Activity and Physico-chemical Surface Properties of the Momentaneously Exposed *Penicillium expansum* Spores to Carvacrol. *Research Journal of Microbiology* 1, 178–185
- Barnett, C., Kumar, M., Whited, G.M., 2009. Enzymatic prevention and control of biofilm. WO2009085743 A1.
- Barrat, C., 1976. Detergent compositions containing enzymes. US3985686 A.
- Barthel, W., Markwardt, F., 1975. Aggregation of blood platelets by adrenaline and its uptake.

- Biochem. Pharmacol. 24, 1903–1904.
- Barton, N., Robertson, D., Chang, K., Elkins, J., 2005. Enzymes and the nucleic acids encoding them and methods for making and using them. WO2004066945A2.
- Beech, I., Hanjagsit, L., Kalaji, M., Neal, A.L., Zinkevich, V., 1999. Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture. Microbiology (Reading, Engl.) 145 (Pt 6), 1491–1497.
- Beloin, C., Ghigo, J.-M., 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. Trends Microbiol. 13, 16–19.
- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J.-M., 2008. *Escherichia coli* biofilms. Curr Top Microbiol Immunol 322, 249–289.
- Bhanwar, S., Ganguli, A., 2014. α -amylase and β -galactosidase production on Potato starch waste by *Lactococcus lactis* subsp lactis isolated from pickled yam. NISCAIR-CSIR, India 324–330.
- Bhaskar, P.V., Bhosle, N.B., 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. Current Science 88, 45–53.
- Birkhed, D., Rosell, K.G., Granath, K., 1979. Structure of extracellular water-soluble polysaccharides synthesized from sucrose by oral strains of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. Arch. Oral Biol. 24, 53–61.
- Bjorland, J., Sunde, M., Waage, S., 2001. Plasmid-borne smr gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 39, 3999–4004.
- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P., 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr. Opin. Microbiol. 9, 588–594.
- Bloom, J.D., Meyer, M.M., Meinhold, P., Otey, C.R., MacMillan, D., Arnold, F.H., 2005. Evolving strategies for enzyme engineering. Curr. Opin. Struct. Biol. 15, 447–452.
- Boivin, P., 1997. Les enzymes en brasserie. Dans “Enzymes en agroalimentaire”., Lavoisier TEC & DOC. ed.
- Boles, B.R., Singh, P.K., 2008. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. PNAS 105, 12503–12508.
- Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K., 2004. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. PNAS 101, 16630–16635.
- Bonnard, N., 2010. Fiche toxicologique glutaraldéhyde. INRS.
- Bonnin, E., Renard, C., Thibault, J., Ducroo, P., 1997. Dans “Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d’action et utilisations alimentaires.”, Lavoisier TEC & DOC. ed.
- Borderie, F., Tête, N., Cailhol, D., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Rieffel, D., Aleya, L., Alaoui-Sossé, B., 2014. Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into combating biofilm development with UV-C treatments. Sci. Total Environ. 484, 43–52.
- Bouزيد, M., Djadi, A., Guechtoulli, S., 2013. Global Approach and Targeted Approach in the Management of Hospital Effluents. Journal of Materials Science and Engineering B 3, 214-225
- Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Watson, G.K., Allison, C., 1997. Effect of conditioning films on oral microbial biofilm development. Biofouling 11, 217–226.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R., 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 11621–11626.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 13, 20–26.
- Braoudaki, M., Hilton, A.C., 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and

- Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 42, 73–78.
- Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H.-C., Wingender, J., 2009. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. *Water Science and Technology: Water Supply* 9, 81–87.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Greub, G., Thomas, V., Briandet, R., 2011a. Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2648–2654.
- Bridier, A., Tischenko, E., Dubois-Brissonnet, F., Herry, J.-M., Thomas, V., Daddi-Oubekka, S., Waharte, F., Steenkeste, K., Fontaine-Aupart, M.-P., Briandet, R., 2011b. Deciphering biofilm structure and reactivity by multiscale time-resolved fluorescence analysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 715, 333–349.
- Budny, J.A., Budny, M.J., 2000. Compositions for controlling bacterial colonization. US6159447 A.
- Bury- Moné, S., 2007. Les biofilms (Polycopié). Ecole Normale Supérieure de Cachan.
- Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G., Roques, C., 2002. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1469–1474.
- Caneva, G., Nugari, M.P., Salvadori, O., Institute, G.C., 2008. *Plant Biology for Cultural Heritage: Biodeterioration and Conservation*. Getty Publications.
- Serran, J.C.S., Jasje, R.A., Begoña RUIZ, P., Litran Tomas, M., 2001. Procédé enzymatique servant à fluidifier ou à détacher des biofilms de différentes interfaces. WO2001053010 A1.
- Carpenter, R.S., Wolff, A.M., Lad, P.J., 1995. Antimicrobial method and formulation employing type II endoglycosidase and antimicrobial agent. EP0425016 B1.
- Castonguay, M.-H., van der Schaaf, S., Koester, W., Krooneman, J., van der Meer, W., Harmsen, H., Landini, P., 2006. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Res. Microbiol.* 157, 471–478.
- Cerf, O., 2002. Risques bactériens liés aux produits laitiers. *Revue Française des Laboratoires* 2002, 67–69.
- Chai, Z., Wang, J., Tao, S., Mou, H., 2014. Application of bacteriophage-borne enzyme combined with chlorine dioxide on controlling bacterial biofilm. *LWT - Food Science and Technology* 59, 1159–1165.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Hébraud, M., 2004. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 241–248.
- Christensen, B.E., Characklis, W.G., 1990. Physical and chemical properties of biofilms 93–130.
- Christensen, R.J., Zivtins, G.J., 1977. Enzymatic dispersion of biological slimes. US4055467 A.
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H.E., Høiby, N., 2005. Occurrence of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients Is Associated with the Oxidative Stress Caused by Chronic Lung Inflammation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2276–2282.
- Clancy, L.J., Critchley, J.A., Leitch, A.G., Kirby, B.J., Ungar, A., Flenley, D.C., 1975. Arterial catecholamines in hypoxic exercise in man. *Clin Sci Mol Med* 49, 503–506.
- Clutterbuck, A.L., Woods, E.J., Knottenbelt, D.C., Clegg, P.D., Cochrane, C.A., Percival, S.L., 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121, 1–17.

- Coenye, T., 2010. Response of sessile cells to stress: from changes in gene expression to phenotypic adaptation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 239–252.
- Collic-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Siquin, C., Fischer, A.M., Guezennec, J., 2004. Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. *Pathologie Biologie* 52, 127–130.
- Collier, E., Jones, J., 1974. Enzyme-containing detergent compositions. US3790482 A.
- Compère, C., Bellon-Fontaine, M.-N., Bertrand, P., Costa, D., Marcus, P., Poleunis, C., Pradier, C.-M., Rondot, B., Walls, M.G., 2001. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling* 17, 129–145.
- Cooper, I.R., White, J., Mahenthiralingam, E., Hanlon, G.W., 2008. Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. *J. Hosp. Infect.* 70, 154–159.
- Conibear, T.C.R., Collins, S.L., Webb, J.S., 2009. Role of Mutation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *PLOS ONE* 4, e6289.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.J., 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 299–324.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Currie, L.A., 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities1: (IUPAC Recommendations 1995). *Pure & Appl. Chem* 67, 1699–1723.
- Cutler, N.A., Viles, H.A., Ahmad, S., McCabe, S., Smith, B.J., 2013. Algal “greening” and the conservation of stone heritage structures. *Science of The Total Environment* 442, 152–164.
- Cvitkovitch, D.G., Li, Y.-H., Ellen, R.P., 2003. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest* 112, 1626–1632.
- Czaczyk, K., Myszka, K., 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. *Polish Journal of Environmental Studies* 799.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., 2003. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185, 1027–1036.
- David M. Manyak, Ronald M. Weiner, Peter S. Carlson, Ernesto J. Quintero, 2004. Preparation and use of biofilm-degrading, multiple-specificity, hydrolytic enzyme mixtures. WO4004041988.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G., 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1181–1186.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.
- Davison, W.M., Pitts, B., Stewart, P.S., 2010. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2920–2927.
- De Alexandre Sebastião, F., Pilarski, F., Lemos, M.V.F., 2013. Composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Flavobacterium columnare* isolated from tropical fish in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 44, 861–864.
- De Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z., 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms.

- Biotechnol. Bioeng. 44, 636–641.
- Delprato, F., Tiefenthaler, K.H.O., De, B.P., Pruvost, G., LEROY, C., 2002. Procédé de préparation d'oligomères de galactomannanes. WO2002006352 A1.
- De Muynck, W., De Belie, N., Verstraete, W., 2010. Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *Journal of Applied Microbiology* 108, 62–72.
- De Sampaio, G., Bourdineaud, J.P., Lauquin, G.J., 1999. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol. Microbiol.* 34, 247–256.
- Desmazeaud, M., Spinnler, E., 1997. Dans “Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisations alimentaires.” Lavoisier TEC & DOC. ed.
- Deva, A.K., Vickery, K., Zou, J., West, R.H., Selby, W., Benn, R.A., Harris, J.P., Cossart, Y.E., 1998. Detection of persistent vegetative bacteria and amplified viral nucleic acid from in-use testing of gastrointestinal endoscopes. *J. Hosp. Infect.* 39, 149–157.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A., 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2950–2958.
- Donlan, R.M., 2008. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 133–161.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8, 881–890.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Donlan, R.M., Priede, J.A., Heyes, C.D., Sani, L., Murga, R., Edmonds, P., El-Sayed, I., El-Sayed, M.A., 2004. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4980–4988.
- Dorman, H.J., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308–316.
- Driffield, K., Miller, K., Bostock, J.M., O'Neill, A.J., Chopra, I., 2008. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1053–1056.
- Dynes, J.J., Lawrence, J.R., Korber, D.R., Swerhone, G.D.W., Leppard, G.G., Hitchcock, A.P., 2009. Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can. J. Microbiol.* 55, 163–178.
- Ebrahimi, A., Hemati, M., Habibian Dehkordi, S., Bahadoran, S., Khoshnood, S., Khubani, S., Dokht Faraj, M., Hakimi Alni, R., 2014. Chlorhexidine Digluconate Effects on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Some Field Isolates of Animal Bacterial Pathogens. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*.9(2), E14298.
- El abed, S., Houari, A., Latrache, H., Remmal, A., Ibsouda, K., S., 2011. In vitro Activity of Four Common Essential Oil Components against Biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Microbiology* 6, 394-401.
- El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Bankova, V., Lourenço, J.P., Costa, A., M., Mariano, J., F., Miguel, M., G., Faleiro, M., L., 2016. Impact of Biohybrid Magnetite Nanoparticles and Moroccan Propolis on Adherence of Methicillin Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 21,1208.
- Elhanafi, D., Dutta, V., Kathariou, S., 2010. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8231–8238.
- Erriu, M., Blus, C., Szmukler-Moncler, S., Buogo, S., Levi, R., Barbato, G., Madonnaripa, D., Denotti, G., Piras, V., Orrù, G., 2014. Microbial biofilm modulation by ultrasound: current concepts and controversies. *Ultrason Sonochem* 21, 15–22.

- Evans, L.R., Linker, A., 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 116, 915–924.
- Faten, K., Hamida, K., Soumya, el A., Saad, IS., Hasna, M., Hassan, L., Moktar, H., 2016. Lactobacillus plantarum: Effect of a protective biofilm on the surface of olives during storage. Braz J Microbiol. 47, 202-9.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623–633.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. Water Sci. Technol. 43, 1–8.
- Fletcher, M., 1976. The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. J. Gen. Microbiol. 94, 400–404.
- Frank, J.F., Koffi, R.A., 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. Journal of food protection. 53,550-554.
- Frølund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H., 1995. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 755–761.
- Fuqua, C., Greenberg, E.P., 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 685–695.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol 176, 269–275.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 13, 34–40.
- Ganeshnarayan, K., Shah, S.M., Libera, M.R., Santostefano, A., Kaplan, J.B., 2009. Poly-N-acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 75, 1308–1314.
- Gaudy, AF, 1962. Colorimetric Determination of Protein and Carbohydrate. Water Waste 7, 17–22.
- Ghazlane, Z., Latrache, H., Mabrouki, M., Houari, A., Ibsouda, K.S., Timinouni, M., Elmdaghri, N., Mliji, El M., 2014. Virulence phenotype, physicochemical properties and biofilm formation of *P. aeruginosa* on polyethylene used in drinking water distribution systems. International Journal of Engineering Research and Applications 4, 75–85.
- Gillings, M.R., Xuejun, D., Hardwick, S.A., Holley, M.P., Stokes, H.W., 2009. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons. ISME. J. 3, 209–215.
- Gillis, R.J., White, K.G., Choi, K.-H., Wagner, V.E., Schweizer, H.P., Iglewski, B.H., 2005. Molecular Basis of Azithromycin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrob Agents Chemother 49, 3858–3867.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. Environ. Microbiol. 7, 894–906.
- Goller, C.C., Romeo, T., 2008. Environmental influences on biofilm development. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322, 37–66.
- Golovlev, E.L., 2002. The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. Mikrobiologiya 71, 293–300.
- Grobe, K.J., Zahller, J., Stewart, P.S., 2002. Role of dose concentration in biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29, 10–15.
- Guérin-Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B., Leveau, J.Y., 1999. Specific variations

- of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity. *J. Appl. Microbiol.* 87, 735–742.
- Gulot, E., Georges, P., Brun, A., Fontaine-Aupart, M.P., Bellon-Fontaine, M.N., Briandet, R., 2002. Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation. *Photochem. Photobiol.* 75, 570–578.
- Haagensen, J.A.J., Klausen, M., Ernst, R.K., Miller, S.I., Folkesson, A., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., 2007. Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* 189, 28–37.
- Habimana, O., Steenkeste, K., Fontaine-Aupart, M.-P., Bellon-Fontaine, M.-N., Kulakauskas, S., Briandet, R., 2011. Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 367–368.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Micro* 2, 95–108.
- Hamadi, F., Asserne, F., Elabed, S., Bensouda, S., Mabrouki, M., Latrache, H., 2014. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control* 38, 104–108.
- Hamadi, F., Latrache, H., Asserne, F., Elabed, S., Zahir, H., Ibensouda, K., S, Hanine, H., Bengourram, J., 2013. Quantitative Adhesion of *Staphylococcus aureus* on Stainless Steel Coated with Milk. *Food and Nutrition Sciences* 4, 299-304
- Hannan, S., Ready, D., Jasni, A.S., Rogers, M., Pratten, J., Roberts, A.P., 2010. Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 345–349.
- Harrison, J.J., Ceri, H., Roper, N.J., Badry, E.A., Sproule, K.M., Turner, R.J., 2005. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 3181–3195.
- Hassett, D.J., Ma, J.F., Elkins, J.G., McDermott, T.R., Ochsner, U.A., West, S.E., Huang, C.T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P.S., McFeters, G., Passador, L., Iglewski, B.H., 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* 34, 1082–1093.
- Hatcher, H., Truda, R., Lechner, T., Mcduff, C., 1973. Slime control in industrial waters. US3773623 A.
- Hausner, M., Wuertz, S., 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3710–3713.
- H, B.C., H, G.B., 1971. Process for application of enzymes to spray-dried detergent granules. US3600319 A.
- Hernandez-Mena, R., Friend, P.L., 1993. Enzyme treatment for industrial slime control. US5238572 A.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332.
- Hollis, C., Terry, J., Jaquess, P., 1995. Composition and methods for removing or preventing biofilm. Brevet Buckman Laboratories international, INC. EP0525166.
- Hope, C.K., Wilson, M., 2004. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1461–1468.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L., 2001. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology (Reading, Engl.)*

- 147, 2517–2528.
- Inamorato, J.T., Jr, R.T.H., 1976. Detergent materials containing enzymes. US3931034 A.
- Irie, Y., Parsek, M.R., 2008. Quorum Sensing and Microbial Biofilms, in: Romeo, T. (Ed.), *Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 67–84.
- Islam, M.S., Richards, J.P., Ojha, A.K., 2012. Targeting drug tolerance in *Mycobacteria*: a perspective from *mycobacterial* biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10, 1055–1066.
- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B.J., Preston, J.F., Romeo, T., 2005. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* 187, 382–387.
- Jang, A., Szabo, J., Hosni, A.A., Coughlin, M., Bishop, P.L., 2006. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 368–376.
- Jayakrishnan, A., Jameela, S.R., 1996. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials, Biomaterials: Processing, Testing and Manufacturing Technology* 17, 471–484.
- Jiao, Y., Cody, G.D., Harding, A.K., Wilmes, P., Schrenk, M., Wheeler, K.E., Banfield, J.F., Thelen, M.P., 2010. Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Acidophilic Microbial Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2916–2922.
- Jia, Z., Ye, Q., Dinaut, A.N., Wang, Q., Waddleton, D., Payette, P., Ramachandran, C., Kennedy, B., Hum, G., Taylor, S.D., 2001. Structure of protein tyrosine phosphatase 1B in complex with inhibitors bearing two phosphotyrosine mimetics. *J. Med. Chem.* 44, 4584–4594.
- Joelsson, A., Kan, B., Zhu, J., 2007. Quorum Sensing Enhances the Stress Response in *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 73, 3742–3746.
- Johansen, C., Falholt, P., Gram, L., 1997. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 63, 3724–3728.
- Jones, M.V., Herd, T.M., Christie, H.J., 1989. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* 58, 49–61.
- Kamgang, J.O., Briandet, R., Herry, J.M., Brisset, J.L., Naïtali, M., 2007. Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air. *J. Appl. Microbiol.* 103, 621–628.
- Kämper, M., Vetterkind, S., Berker, R., Hoppert, M., 2004. Methods for in situ detection and characterization of extracellular polymers in biofilms by electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 57, 55–64.
- Kelly, B.G., Vespermann, A., Bolton, D.J., 2009. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology, Early Awareness of Emerging Risks to Food and Feed Safety* 47, 969–977.
- Kenne, L., Lindberg, B., 1983. In: *The Polysaccharides*, vol 2 (Aspinall GO, ed), Academic Press, New York. Academic Press, *Bacterial polysaccharides*.
- Kirisits, M.J., Prost, L., Starkey, M., Parsek, M.R., 2005. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4809–4821.
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* 50, 61–68.
- Kovács, Á.T., 2014. Impact of spatial distribution on the development of mutualism in microbes. *Front. Microbiol.* 5, 649.
- Królasik, J., Zakowska, Z., Krepska, M., Klimek, L., 2010. Resistance of bacterial biofilms

- formed on stainless steel surface to disinfecting agent. *Pol. J. Microbiol.* 59, 281–287.
- Kumar, C.G., Anand, S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 9–27.
- Kumar, M., Hugh, C.M., Poulouse, A.J., Rand, T., Wang, H., 2008. Polyol oxydases. WO2008051491 A3.
- Kvist, M., Hancock, V., Klemm, P., 2008. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7376–7382.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 186, 692–698.
- Lakhdar, L., Hmamouchi, M., Rida, S., Ennibi, O., 2012. Antibacterial activity of essential oils against periodontal pathogens: a qualitative systematic review. *Odontostomatol Trop.* 35,38-46.
- Latrach, L., Ouazzani, N., Masunaga, T., Hejjaj, A., Bouhoum, K., Mahid, M., Mandi, L., 2016. Domestic wastewater disinfection by combined treatment using multi-soil-layering system and sand filters (MSL–SF): A laboratory pilot study. *J. Ecological Engineering* 91, 294–301.
- Lambert, R.J., Johnston, M.D., 2001. The effect of interfering substances on the disinfection process: a mathematical model. *J. Appl. Microbiol.* 91, 548–555.
- Langsrud, S., Sidhu, M.S., Heir, E., Holck, A.L., 2003. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation, Hygiene and Disinfection* 51, 283–290.
- Lasa, I., Penadés, J.R., 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* 157, 99–107.
- Ledder, R.G., Timperley, A.S., Friswell, M.K., Macfarlane, S., McBain, A.J., 2008. Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 630–636.
- Le Fol, T., Vaillant, C., 2009. Traitement des endoscopes : état de l’art et application au centre hospitalier universitaire d’Angers. IRBM, NUMÉRO SPÉCIAL TECHNOLOGIES POUR L’AUTONOMIE 30, 292–301.
- Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar, C., Kolter, R., 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 1–16.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., Faille, C., 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26, 421–431.
- Leroy, C., 2006. Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C., Combes, D., 2008. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling* 24, 11–22.
- Leroy, C., Delbarre-Ladrat, C., Ghillebaert, F., Rochet, M.J., Compère, C., Combes, D., 2007. A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 372–378.
- Letartre B., 2002. Composition pour le traitement d’objets destinés à être désinfectés. FR2818150.
- Letartre, B., 1998. Protéases pour inhiber et éliminer la formation d’un film biologique. EP0590746B1.
- Levi, Y., 2001. Écologie microbienne des réseaux d’eau potable et risque microbiologique : l’exemple de *Legionella pneumophila*. *Revue Française des Laboratoires* 2001, 33–37.
- Lewis, K., 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 107–131.

- Lewis, K., 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry Mosc.* 70, 267–274.
- Lewis, K., 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999–1007.
- Licht, T.R., Christensen, B.B., Krogfelt, K.A., Molin, S., 1999. Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology (Reading, Engl.)* 145 (Pt 9), 2615–2622.
- Lisle, J.T., Broadaway, S.C., Prescott, A.M., Pyle, B.H., Fricker, C., McFeters, G.A., 1998. Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4658–4662.
- Liu, C.-L., 1990. Alginate lyase thermophile du bacillus stearothermophilus nrrl b-18394. WO1990002794 A1.
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95, 249–256.
- Liu, Y., Yang, S.-F., Li, Y., Xu, H., Qin, L., Tay, J.-H., 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J. Biotechnol.* 110, 251–256.
- Loeb, G.I., Neihof, R.A., 1975. Marine Conditioning Films, in: *Applied Chemistry at Protein Interfaces*, Advances in Chemistry. American Chemical Society, pp. 319–335.
- Loiselle, M., Anderson, K.W., 2003. The use of cellulase in inhibiting biofilm formation from organisms commonly found on medical implants. *Biofouling* 19, 77–85.
- Lumjiaktase, P., Diggle, S.P., Loprasert, S., Tungpradabkul, S., Daykin, M., Cámara, M., Williams, P., Kunakorn, M., 2006. Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 152, 3651–3659.
- Maeda, S., Ito, M., Ando, T., Ishimoto, Y., Fujisawa, Y., Takahashi, H., Matsuda, A., Sawamura, A., Kato, S., 2006. Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 115–120.
- Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J.S., Sanchez-Amat, A., Kjelleberg, S., 2008. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 190, 5493–5501.
- Makar, A.B., McMartin, K.E., Palese, M., Tephly, T.R., 1975. Formate assay in body fluids: application in methanol poisoning. *Biochem Med* 13, 117–126.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathog* 5.
- Mangalappalli-Illathu, A.K., Korber, D.R., 2006. Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3588–3596.
- Mangalappalli-Illathu, A.K., Vidović, S., Korber, D.R., 2008. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3669–3680.
- Marcato-Romain, C.E., Pechaud, Y., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., Dossat-Létisse, V., 2012. Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. *Biofouling* 28, 305–314.
- Marion, K., Sanchez, T., 2004. Procédé d'élimination du biofilm. WO4004041988.
- Maris, P., 1995. Modes of action of disinfectants. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 14, 47–55.
- Martin, D.J.H., Denyer, S.P., McDonnell, G., Maillard, J.-Y., 2008. Resistance and cross-resistance to oxidising agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors. *J. Hosp. Infect.* 69, 377–383.
- Massicotte, R., 2009. Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes

- fondamentaux. MSSS, Québec.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Saarela, M., 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 327–356.
- Mausner Marvin, L., Wiesenfeld, A., 1972. Stable enzyme containing liquid detergent. US3697451 A.
- McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147–179.
- McLean, R.J.C., McGowin, C.L., Barnes, M.B., Aron, G.M., Bates, C.L., 2004. Methods of Studying Biofilms, in: O’Toole, G.A., Ghannoum, M. (Eds.), *Microbial Biofilms*. American Society of Microbiology, pp. 379–413.
- Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B., Leveau, J.Y., 1999. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J. Appl. Microbiol.* 86, 859–866.
- Melo, L.F., Bott, T.R., 1997. Biofouling in water systems. *Experimental Thermal and Fluid Science, Heat Exchange Fouling* 14, 375–381.
- Meyer, B., Cookson, B., 2010. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *J. Hosp. Infect.* 76, 200–205.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* 37, 790–796, 798–802.
- Mitchell, B.A., Brown, M.H., Skurray, R.A., 1998. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 475–477.
- Miyajima, N., Hata, K., Nakayama, J., 1987. Detergent composition for contact lenses. US4710313 A.
- Mliji, El M., Hamadi, F., Latrache, H., Cohen, N., El Ghmari, A., Timinouni, M., 2007. Association between plasmid carrying an expanded-spectrum cephalosporin resistance and biofilm formation in *Escherichia coli*. *New Microbiol.* 30(1), 19–27.
- Mliji, El M., 2009. Etude de l’adhésion bactérienne et la formation de biofilms sur les surfaces du secteur agroalimentaire : Cas de *Pseudomonas* sur la canalisation d’eau potable et de *Salmonella* spp sur l’acier inoxydable. Etude doctorale.
- Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 255–261.
- Molobela, I.P., Cloete, T.E. (Thomas E., Beukes, M., 2010. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 4(14), 1515–1524
- Moreau-Marquis, S., Bomberger, J.M., Anderson, G.G., Swiatecka-Urban, A., Ye, S., O’Toole, G.A., Stanton, B.A., 2008. The DeltaF508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 295, L25–37.
- Moss, M.L., Powell, G., Miller, M.A., Edwards, L., Qi, B., Sang, Q.-X.A., De Strooper, B., Tesseur, I., Lichtenthaler, S.F., Taverna, M., Zhong, J.L., Dingwall, C., Ferdous, T., Schlomann, U., Zhou, P., Griffith, L.G., Lauffenburger, D.A., Petrovich, R., Bartsch, J.W., 2011. ADAM9 Inhibition Increases Membrane Activity of ADAM10 and Controls α -Secretase Processing of Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* 286, 40443–40451.

- Nadell, C.D., Bassler, B.L., 2011. A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 14181–14185.
- NCCLS, National committee for clinical Laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 7th (Ed). (Wayne, PA., 2006) M7-A7
- Nett, J.E., Guite, K.M., Ringeisen, A., Holoyda, K.A., Andes, D.R., 2008. Reduced Biocide Susceptibility in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3411–3413.
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 1999. Lectin-binding analysis in biofilm systems. *Meth. Enzymol.* 310, 145–152.
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 1999. In Situ Characterization of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Biofilm Systems, in: Wingender, D.J., Neu, D.T.R., Flemming, P.D.H.-C. (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 21–47.
- Neu, T.R., Woelfl, S., Lawrence, J.R., 2004. Three-dimensional differentiation of photoautotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J. Microbiol. Methods* 56, 161–172.
- Nguyen, K.T., Piastro, K., Gray, T.A., Derbyshire, K.M., 2010. *Mycobacterial* Biofilms Facilitate Horizontal DNA Transfer between Strains of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 192, 5134–5142.
- Nielsen, P.H., Jahn, A., 1999. Extraction of EPS, in: Wingender, D.J., Neu, D.T.R., Flemming, P.D.H.-C. (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 49–72.
- Norde, W., Favier, J.P., 1992. Structure of adsorbed and desorbed proteins. *Colloids and Surfaces* 64, 87–93.
- Nugari, M.P., Pietrini, A.M., Caneva, G., Imperi, F., Visca, P., 2009. Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 705–711.
- Okuda, K., Urabe, I., Yamada, Y., Okada, H., 1991. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, 100–105.
- Orgaz, B., Kives, J., Pedregosa, A.M., Monistrol, I.F., Laborda, F., SanJosé, C., 2006. Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. *Enzyme and Microbial Technology, Papers from the 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld-2005)* 40, 51–56.
- O’Toole, G.A., Gibbs, K.A., Hager, P.W., Phibbs, P.V., Kolter, R., 2000. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 425–431.
- O’Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295–304.
- Otto, M., 2008. *Staphylococcal* Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 207–228.
- Oufrid, S., Ghazlane, Z., Jamali, L., El Otmani, F., Talmi, M., Elmdaghri, N., Zerouali, K., Timinouni, M., 2015. Correlation between staphylococcal biofilm formation in vitro and potential for catheter-related infections. *J. Infect. Dev. Ctries.* 9(4), 368–372.
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8789–8793.
- Pham, T.K., Roy, S., Noirel, J., Douglas, I., Wright, P.C., Stafford, G.P., 2010. A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics* 10, 3130–3141.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zilver, N., Stewart, P.S., 2003. A microtiter-plate screening

- method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods* 54, 269–276.
- Pontes, M.H., Babst, M., Lochhead, R., Oakeson, K., Smith, K., Dale, C., 2008. Quorum Sensing Primes the Oxidative Stress Response in the Insect Endosymbiont, *Sodalis glossinidius*. *Plos One* 3, e3541.
- Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 20–51.
- Pradier, C.M., Rubio, C., Poleunis, C., Bertrand, P., Marcus, P., Compère, C., 2005. Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. *J Phys Chem B* 109, 9540–9549.
- Prakash, B., Veeregowda, B., Krishnappa, G., 2003. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *current science* 85, 1299–1307.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., Dorel, C., 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol.* 183, 7213–7223.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C., 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.* 2, 450–464.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 5993–6002.
- Proft, T., Baker, E.N., 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 613–635.
- Razika, B., Abbes, B., Messaoud, C., Soufi, K., 2010. Phenol and Benzoic Acid Degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Water Resource and Protection* 02, 788–791.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W., Wood, T.K., 2004. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 515–524.
- Rice, A.R., Hamilton, M.A., Camper, A.K., 2003. Movement, replication, and emigration rates of individual bacteria in a biofilm. *Microb. Ecol.* 45, 163–172.
- Roberts, M.E., Stewart, P.S., 2005. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 75–80.
- Roche, D.M., Byers, J.T., Smith, D.S., Glansdorp, F.G., Spring, D.R., Welch, M., 2004. Communications blackout? Do N-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 2023–2028.
- Rochex, A., Lebeault, J.-M., 2007. Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. *Water Res.* 41, 2885–2892.
- Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R., Guezennec, J., 1999. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.* 322, 40–45.
- Rubio, C., 2002. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Université Paris 6.
- Russell, A.D., 2003a. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 750–763.
- Russell, A.D., 2003b. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 3, 794–803.
- Russell, A.D., 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J. Hosp. Infect.* 43 Suppl, S57–68.

- Sabev, H.A., Robson, G.D., Handley, P.S., 2006. Influence of starvation, surface attachment and biofilm growth on the biocide susceptibility of the biodeteriogenic yeast *Aureobasidium pullulans*. *J. Appl. Microbiol.* 101, 319–330.
- Saby, S., Leroy, P., Block, J.-C., 1999. *Escherichia coli* Resistance to Chlorine and Glutathione Synthesis in Response to Oxygenation and Starvation. *Appl Environ Microbiol* 65, 5600–5603.
- Sadiki, M., Elabed, S., Barkai, H., Laachari, F., Ibsouda, S. K., 2015. The impact of *Thymus vulgaris* extractives on cedar wood surface energy: Theoretical and experimental of *Penicillium* spores adhesion. *Industrial Crops and Products* 77, 1020–1027.
- Sadiki, M., Elabed, S., Barkai, H., Balouiri, M., Ibsouda, S. K., 2016. Plant Extracts Effect on the Cell Fungal Surface Hydrophobicity and Acid-base Properties. *Research Journal of Microbiology* 11, 139–145.
- Sandt, C., Barbeau, J., Gagnon, M.-A., Lafleur, M., 2007. Role of the ammonium group in the diffusion of quaternary ammonium compounds in *Streptococcus mutans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1281–1287.
- San, J.S.C., Jaspe, R.A., RUIZ, P.B., Maira, L.T., 2001. Enzymatic process for fluidizing or detaching biofilms from different interfaces. WO2001053010 A1.
- Sano, L.L., Krueger, A.M., Landrum, P.F., 2005. Chronic toxicity of glutaraldehyde: differential sensitivity of three freshwater organisms. *Aquat. Toxicol.* 71, 283–296.
- Sano, L.L., Moll, R.A., Krueger, A.M., Landrum, P.F., 2003. Assessing the Potential Efficacy of Glutaraldehyde for Biocide Treatment of Un-ballasted Transoceanic Vessels. *Journal of Great Lakes Research* 29, 545–557.
- Sauer, K., Camper, A.K., 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* 183, 6579–6589.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140–1154.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L. a. H., Davies, D.G., Gilbert, P., 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* 186, 7312–7326.
- Sava, A., 2004. Traitement de micro-organismes dans l'eau au moyen d'enzymes conditionnées par du bore. WO2004002896 A1.
- Schakenraad, J.M., Busscher, H.J., 1989. Selected Papers from a Symposium on Surface and Transport Phenomena in Bioparticle Adhesion, held at the Third Chemical Congress of North America Cell—polymer interactions: The influence of protein adsorption. *Colloids and Surfaces* 42, 331–343.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C., 2009. Microbial deterioration of stone monuments--an updated overview. *Adv. Appl. Microbiol.* 66, 97–139.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P., 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48, 253–267.
- Schürks, N., Wingender, J., Flemming, H.-C., Mayer, C., 2002. Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* 30, 105–111.
- Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U., 2003. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 95, 591–601.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 325–335.
- Servagent-Noinville, null, Revault, null, Quiquampoix, null, Baron, null, 2000.

- Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Induced by Adsorption on Different Clay Surfaces: FTIR Analysis. *J Colloid Interface Sci* 221, 273–283.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., Lewis, K., 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 6, 53.
- Shemesh, M., Kolter, R., Losick, R., 2010. The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC. *J. Bacteriol.* 192, 6352–6356.
- Simões, M., Carvalho, H., Pereira, M.O., Vieira, M.J., 2003. Studies on the behaviour of *Pseudomonas fluorescens* biofilms after Ortho-phthalaldehyde treatment. *Biofouling* 19, 151–157.
- Smith, K., Hunter, I.S., 2008. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 57, 966–973.
- Sosa, R., 1996. Surface modification of carbon black by oxidation and its influence on the activity of immobilized catalase and iron-phthalocyanines. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 110, 141–151.
- Spormann, A.M., 2008. Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 17–36.
- Stanislowski, A.G., Wiersema, R.J., 1985. Cooperative enzymes comprising alkaline or mixtures of alkaline and neutral proteases without stabilizers. US4511490 A.
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., Weiss, E.I., 2005. Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 247–251.
- Steinmoen, H., Knutsen, E., Håvarstein, L.S., 2002. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7681–7686.
- Stewart, M.H., Olson, B.H., 1992. Impact of growth conditions on resistance of *Klebsiella pneumoniae* to chloramines. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2649–2653.
- Stewart, P.S., 2003. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 1485–1491.
- Stewart, P.S., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 107–113.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 199–210.
- Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F., Rees, W.M., 2001. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J. Appl. Microbiol.* 91, 525–532.
- Stewart, P.S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J.G., Lewandowski, Z., Ochsner, U.A., Hassett, D.J., 2000. Effect of Catalase on Hydrogen Peroxide Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 66, 836–838.
- Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., Pombo, A., 2007. Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 1428–1435.
- Stoodley, P., deBeer, D., Lewandowski, Z., 1994. Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol* 60, 2711–2716.
- Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Lappin-Scott, H.M., 2001. Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Meth. Enzymol.* 337, 306–319.
- Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H.-C., 2002. Application of fluorescently labelled

- lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Microbiol. Methods 50, 237–248.
- Sutherland, I.W., 2001. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. Trends Microbiol. 9, 222–227.
- Sutherland, I.W., 1999. Biofilm Exopolysaccharides, in: Wingender, D.J., Neu, D.T.R., Flemming, P.D.H.-C. (Eds.), Microbial Extracellular Polymeric Substances. Springer Berlin Heidelberg, pp. 73–92.
- Tabbene, O., Azaiez, S., Di Grazia, A., Karkouch, I., Ben Slimene, I., Elkahoui, S., Alfeddy, M.,N., Casciaro, B., Luca, V., Limam, F., Mangoni, M.,L., 2016. Bacillomycin D and its combination with amphotericin B: promising antifungal compounds with powerful antibiofilm activity and wound-healing potency. J Appl Microbiol. 120, 289-300.
- Takenaka, S., Trivedi, H.M., Corbin, A., Pitts, B., Stewart, P.S., 2008. Direct Visualization of Spatial and Temporal Patterns of Antimicrobial Action within Model Oral Biofilms. Appl Environ Microbiol 74, 1869–1875.
- Taneja, N., Biswal, M., Kumar, A., Edwin, A., Sunita, T., Emmanuel, R., Gupta, A.K., Sharma, M., 2011. Hydrogen peroxide vapour for decontaminating air-conditioning ducts and rooms of an emergency complex in northern India: time to move on. J. Hosp. Infect. 78, 200–203.
- Tarrass, F., Benjelloun, M., Benjelloun, O., 2010. Current understanding of ozone use for disinfecting hemodialysis water treatment systems. Blood Purif. 30, 64-70.
- Taylor, G.T., Zheng, D., Lee, M., Troy, P.J., Gyananath, G., Sharma, S.K., 1997. Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters. Biofouling 11, 31–57.
- Taylor, R.H., Falkinham, J.O., Norton, C.D., Le Chevallier, M.W., 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1702–1705.
- Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., Spormann, A.M., 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. J. Bacteriol. 188, 2681–2691.
- Thurnheer, T., Gmür, R., Shapiro, S., Guggenheim, B., 2003. Mass Transport of Macromolecules within an In Vitro Model of Supragingival Plaque. Appl Environ Microbiol 69, 1702–1709.
- Tolker-Nielsen, T., Molin, S., 2000. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. Microb. Ecol. 40, 75–84.
- Tomlin, K.L., Malott, R.J., Ramage, G., Storey, D.G., Sokol, P.A., Ceri, H., 2005. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5208–5218.
- Ton-That, H., Marraffini, L.A., Schneewind, O., 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. Biochim. Biophys. Acta 1694, 269–278.
- Top, E.M., Springael, D., 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 262–269.
- Trémoulet, F., Duché, O., Namane, A., Martinie, B., The European Listeria Genome Consortium, Labadie, J. c., 2002. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. FEMS Microbiology Letters 210, 25–31.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., Hirata, A., 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. FEMS Microbiol. Lett. 223, 287–292.
- Urbina, A., Park, J.S., Lee, J.M., Kim, S.O., Kim, J.-S., 2013. Work function engineering of ZnO electrodes by using p-type and n-type doped carbon nanotubes. Nanotechnology

- 24, 484013.
- Utili, R., Durante-Mangoni, E., Tripodi, M.-F., 2007. Infection of intravascular prostheses: how to treat other than surgery. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 Suppl 1, S42–50.
- van der Aa, B.C., Dufrêne, Y.F., 2002. In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23, 173–182.
- van der Weijden, F., 2007. *The Power of Ultrasonics*. Quintessence International.
- van Gestel, J., Weissing, F.J., Kuipers, O.P., Kovács, A.T., 2014. Density of founder cells affects spatial pattern formation and cooperation in *Bacillus subtilis* biofilms. *ISME J* 8, 2069–2079.
- Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156, 626–633.
- Van, P.K.L.I., Van, S.M.M.P., Van, P.J., 1996. Use of mannanases as slime control agents. WO1996036569 A1.
- Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., Nesse, L.L., 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research* 5, 20.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., Lejeune, P., 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* 180, 2442–2449.
- Villagra, N.A., Hidalgo, A.A., Santiviago, C.A., Saavedra, C.P., Mora, G.C., 2008. SmvA, and not AcrB, is the major efflux pump for acriflavine and related compounds in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1273–1276.
- Vishu Kumar, A.B., Varadaraj, M.C., Lalitha, R.G., Tharanathan, R.N., 2004. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1670, 137–146.
- Walker, S.L., Fourgialakis, M., Cerezo, B., Livens, S., 2007. Removal of Microbial Biofilms from Dispense Equipment: The Effect of Enzymatic Pre-digestion and Detergent Treatment. *Journal of the Institute of Brewing* 113, 61–66.
- Wang, X., Preston, J.F., Romeo, T., 2004. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186, 2724–2734.
- Wanner, O., Bauchrowitz, M., 2006. Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News* 60 f, 4–7.
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., Bassler, B.L., 2008. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of vpsT. *J. Bacteriol.* 190, 2527–2536.
- Webb, T.M.A., Lilly, S.J., Clements, D.L., Eales, S., Yun, M., Brodwin, M., Dunne, L., Gear, W.K., 2003. The Canada-UK Deep Submillimeter Survey. VII. Optical and Near-Infrared Identifications for the 14 Hour Field. *ApJ* 597, 680.
- Weber, M.M., 1979. Liquid cleaning composition containing stabilized enzymes. US4169817 A.
- Weese, J.S., Rousseau, J., Willey, B.M., Archambault, M., McGeer, A., Low, D.E., 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 182–186.
- Welin, J., Wilkins, J.C., Beighton, D., Svensäter, G., 2004. Protein Expression by *Streptococcus mutans* during Initial Stage of Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 70, 3736–3741.
- Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., Stewart,

- P.S., 2004. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6188–6196.
- Whiteley, M., Bangera, 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.
- Wiater, A., Szczodrak, J., Rogalski, J., 2004. Hydrolysis of mutan and prevention of its formation in streptococcal films by fungal α -d-glucanases. *Process Biochemistry* 39, 1481–1489.
- Wiatr, C.L., 1990. Controlling industrial slime. EP0388115 A1.
- Wingender, J., Jaeger, K.-E., Flemming, H.-C., 1999. Interaction Between Extracellular Polysaccharides and Enzymes, in: Wingender, D.J., Neu, D.T.R., Flemming, P.D.H.-C. (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer Berlin Heidelberg, 231–251.
- Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Trengove, R.D., O’Handley, R.M., 2010. Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella Typhimurium* biofilms to disinfectants. *J. Appl. Microbiol.* 108, 2222–2228.
- Wong, L., C, A., 1998. Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science* 81, 2765–2770.
- Xavier, J.B., Picioreanu, C., Rani, S.A., van Loosdrecht, M.C.M., Stewart, P.S., 2005. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix--a modelling study. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 3817–3832.
- Xu, F., 2004. Methods for eliminating the formation of biofilm. US6777223 B2.
- Xu, K.D., Franklin, M.J., Park, C.H., McFeters, G.A., Stewart, P.S., 2001. Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 199, 67–71.<c
- Xu, K.D., Stewart, P.S., Xia, F., Huang, C.-T., McFeters, G.A., 1998. Spatial Physiological Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Is Determined by Oxygen Availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4035–4039.
- Yacoby-Zeevi, O., 2002. Compositions including glycosaminoglycans degrading enzymes and use of same against surface protected bacteria. US6423312 B1.
- Zhang, P., Fang, F., Chen, Y.-P., Shen, Y., Zhang, W., Yang, J.-X., Li, C., Guo, J.-S., Liu, S.-Y., Huang, Y., Li, S., Gao, X., Yan, P., 2014. Composition of EPS fractions from suspended sludge and biofilm and their roles in microbial cell aggregation. *Chemosphere* 117, 59–65.
- Zhang, T., Fang, H.H.P., 2001. Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology Letters* 23, 405–409.



Résumé

Les biofilms peuvent être à l'origine de problèmes sérieux dont l'impact économique et sanitaire est considérable. Dans le but de développer des produits anti-adhésion et anti-biofilm moins toxiques pour l'environnement, nous avons mis au point un test modèle adapté aux milieux industriel, médical et environnemental permettant ainsi de détecter le potentiel de préparations désinfectantes et enzymatiques de type hydrolases à prévenir la formation ou éliminer les biofilms. Sept bactéries modèles ont été choisies pour leur forte adhésion en représentant les secteurs les plus touchés : Le secteur agroalimentaire représenté par *Escherichia coli* E1525 développée sur des billes de verre et *Salmonella* spp S3349 développée sur des billes d'inox ; le secteur médical représenté par *Staphylococcus warneri* K9 et *Staphylococcus sciuri* K17 développées sur le polystyrène, et par *Staphylococcus aureus* K1 et *Streptococcus pyogènes* P4 développées sur des coupons de cathéter ; le secteur environnemental représenté par *Pseudomonas aeruginosa* P59 développée sur des coupons cylindriques de polyéthylène. Le test développé permet également de vérifier la toxicité des préparations désinfectantes et enzymatiques sur les cellules non adhérentes par déterminations de CMI et CMB. D'ailleurs, les souches modèles étudiées en biofilms présentent une certaine résistance contre les désinfectants étudiés par rapport aux enzymes. Le désinfectant P4 est plus efficace et présente un effet préventif et curatif plus important en combinant entre trois principes actifs qui sont l'alcool, le chlore et le biguanide. *Salmonella* spp S3349 est la souche la plus résistante en biofilm aux désinfectants et la plus sensible à l'action des enzymes. Les taux d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en enzyme est une courbe sigmoïde de type dose-réponse pour certaines enzymes et une courbe sous forme de plateau qui atteint rapidement un maximum d'efficacité pour d'autres enzymes. Les protéases se sont révélées plus efficaces que les glycosidases en prévention comme en lavage pour les trois souches de *Staphylococcus* étudiées. Alors que pour *P. aeruginosa* P59 et *Salmonella* spp S3349, les glycosidases se sont démontrées plus efficaces que les protéases en prévention comme en lavage. Tandis que pour *E. coli* E1525 et *Streptococcus pyogènes* P4, les glycosidases se sont révélées plus efficaces que les protéases en prévention, or en lavage il semble que les protéases présentent une efficacité ayant une tendance à augmenter par rapport à la prévention d'un biofilm. L'étude de la composition de substances polymériques EPS produites par les sept bactéries modèles en fermenteur et au sein d'un biofilm a permis de mieux comprendre la nature des molécules organiques cibles impliquées dans l'inhibition de l'adhésion et l'élimination de biofilm.

Mots clés : anti-adhésion, anti-biofilm, désinfectants, enzymes, EPS, inox, verre, cathéter, tuyau de polyéthylène, extraction, élimination.