



Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermique

Coline Pessereau

► To cite this version:

Coline Pessereau. Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermique. Génie des procédés. Ecole des Mines de Nantes, 2015. Français. ⟨NNT : 2015EMNA0244⟩. ⟨tel-01296480⟩

HAL Id: tel-01296480

<https://theses.hal.science/tel-01296480v1>

Submitted on 1 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Thèse de Doctorat

Coline PESSEREAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'École des Mines de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture*

Discipline : Génie des procédés

Spécialité : Microbiologie / Environnement

Unité de recherche : GEPEA UMR CNRS 6144/CSTB NANTES

Soutenue le 04 novembre 2015

Thèse N°: 2015 EMNA 0244

Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale.

JURY

Rapporteurs :
Christine IMBERT, Professeur, Université de Poitiers
Christine ROQUES, Professeur, Université de Toulouse

Examineurs :
Jean-Claude BLOCK, Professeur, Université de Lorraine

Directeur de Thèse :
Yves ANDRES, Professeur, Ecole des Mines de Nantes

Co-directeur de Thèse :
Sophie de BENTZMANN, Directrice de recherche, INSERM

Co-encadrante :
Nathalie GARREC, Docteur, Centre Scientifique et Technique du bâtiment

Thèse de Doctorat

Coline PESSEREAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'École des Mines de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture*

Discipline : Génie des procédés

Spécialité : Microbiologie / Environnement

Unité de recherche : GEPEA UMR CNRS 6144/CSTB NANTES

Soutenue le 04 novembre 2015

Thèse N°: 2015 EMNA 0244

Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale.

JURY

Rapporteurs :
Christine IMBERT, Professeur, Université de Poitiers
Christine ROQUES, Professeur, Université de Toulouse

Examineurs :
Jean-Claude BLOCK, Professeur, Université de Lorraine

Directeur de Thèse :
Yves ANDRES, Professeur, Ecole des Mines de Nantes

Co-directeur de Thèse :
Sophie de BENTZMANN, Directrice de recherche, INSERM

Co-encadrante :
Nathalie GARREC, Docteur, Centre Scientifique et Technique du bâtiment

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier M. Yves Andres, professeur à l'Ecole des Mines de Nantes, et Mme Sophie De Bentzmann, directrice de recherche INSERM et attachée scientifique à l'ambassade de France à Pékin, d'avoir accepté d'être mes directeurs de thèse.

Merci Yves pour ta bienveillance, ta présence et pour la transmission de tes connaissances scientifiques. Ton indulgence et ta compréhension m'ont été d'un grand secours tout au long de mes travaux de thèse.

Merci Sophie pour ta rigueur scientifique et ta présence malgré un emploi du temps chargé et des kilomètres de distance. Je tiens également à te remercier pour m'avoir accueillie au sein de l'unité de recherche du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires de Marseille, et m'avoir transmis les connaissances et compétences nécessaires à l'aboutissement de mes travaux.

Mes plus sincères remerciements vont à Mme Nathalie Garrec, ingénieure recherche et expertise au CSTB, pour sa confiance, sa patience et sa présence au quotidien. Merci d'avoir pris le temps de comprendre mon fonctionnement, de m'avoir épaulée et menée jusqu'au bout malgré les difficultés et les doutes rencontrés.

Je remercie M. Jean-Michel Axes, directeur du CSTB de Nantes, et M. Philippe Humeau, responsable de la thématique eau et assainissement, de m'avoir accueillie au sein d'AQUASIM.

Mes remerciements vont également à M. Christophe Bordi, chercheur au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires de Marseille, pour m'avoir patiemment formée à l'utilisation des puces à ADN et à l'extraction d'ARN.

Je tiens également à remercier Mme Céline Ohayon-Courtès, professeur à l'université de Bordeaux pour nous avoir renseignés sur le fonctionnement du milieu thermal et pour nous avoir fourni des souches isolées de réseaux de distribution d'eau thermale.

Je remercie également M. David Redelberger, ingénieur au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires de Marseille, pour m'avoir transmis ses connaissances et compétences et pour m'avoir accordé tant d'attention.

Remerciements

Merci à Nathalie Quellard et Béatrice Fernandez, ingénieures de recherche au service d'anatomie et de cytologie pathologique du CHU de Poitiers pour m'avoir transmis leur passion et leur connaissance de la microscopie électronique à balayage appliquée aux échantillons biologiques.

Merci également à Nicolas Stephant pour la métallisation et l'observation de mes échantillons en microscopie électronique à balayage.

Merci à Félicie Théron pour la gestion du matériel et la réservation des séances de microscopie électronique à balayage.

Merci à toute l'équipe du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires de Marseille qui m'a si gentiment accueillie et fait une petite place dans leur bureau et sur leur paillasse chaque fois que c'était nécessaire.

Un grand merci à toute l'équipe d'AQUASIM pour ces trois ans passés ensemble avec une mention spéciale à Marc Bodelle et Patrice Metaireau. Merci d'avoir été à mes côtés à votre façon, merci pour cette ambiance sympathique.

Merci à Marina Postnikoff pour la gestion des commandes et des petits tracas de la vie quotidienne au laboratoire.

Merci aux éléments déclencheurs, Alex et Alan : sans aucun regret !

Merci à Gwen, Séverine et Julien pour leur soutien à distance.

Merci à tous mes amis de longues dates ou rencontrés au cours de ma thèse : merci à Fanny, Emilie, Aurore, Gwen, Pierre-Luc, Julie, Chen, Nicolas, Pierre, Bryan, Nico, Alexia et Léonie.

Un grand merci à mes parents et mes sœurs pour leur soutien sans faille et à toute ma nombreuse famille, oncles, tantes, cousins et à mon grand-père.

Merci à Emmanuel pour qui aucun mot ne saurait traduire ma gratitude et mon amour.

Résumé et mots-clés en français

Les eaux minérales naturelles se distinguent de l'eau potable par leur contenu en sels minéraux et en éléments traces. Leur utilisation à des fins thérapeutiques s'effectue sous contrôle médical dans des établissements thermaux. La gestion des réseaux de distribution ainsi que la qualité microbiologique de l'eau font l'objet de réglementations. Malgré la mise en place de procédures spécifiques, les établissements thermaux sont régulièrement confrontés à des contaminations microbiologiques majoritairement dues à *P. aeruginosa*. Ce pathogène opportuniste possède d'importantes capacités d'adaptation, de résistance et de persistance dans l'environnement, notamment sous forme de biofilms.

L'objectif de ces travaux de thèse est d'apporter des éléments de compréhension sur le comportement de *P. aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau minérale naturelle et de valider l'efficacité de produits de traitement.

L'influence de la composition minérale de 3 eaux sur les capacités à former du biofilm de 9 souches de *P. aeruginosa* d'origines diverses a pu être démontrée. Il apparaît que les quantités de biofilms produites au bout de 24 h sont moins importantes pour la minéralisation forte. La modulation de la production de facteurs de virulence en fonction de la qualité de l'eau est corrélée à l'action spécifique de certains ions et à la biodisponibilité du fer. En conditions de minéralisation forte il a été montré que les matériaux organiques favorisent la formation de biofilm de *P. aeruginosa* tandis que les matériaux métalliques ont tendance à la défavoriser. L'efficacité d'une séquence de traitement de postes de soins a pu être validée sur un modèle de biofilm âgé de 24 h et sur tous les matériaux.

- Eaux thermales
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Biofilm
- Minéralisation
- Matériaux
- Désinfection

Résumé et mots-clés en anglais

Natural mineral waters are distinguished from drinking water by their content in minerals and trace elements. Their use for therapeutic purposes under medical control is performed in spas. Management of distribution networks and the microbiological quality of water are subject to regulations. Despite the establishment of specific procedures, spas are regularly confronted with microbiological contamination mainly due to *P. aeruginosa*. This opportunistic pathogen has substantial adaptive capacity, resistance and persistence in the environment, under biofilm.

The aim of this thesis work is to bring understanding on the *P. aeruginosa* behaviour in the natural mineral water distribution networks and validate the effectiveness of treatment products.

The influence of the mineral composition of 3 waters on biofilm formation capacity of 9 *P. aeruginosa* strains of various origins could be demonstrated. It appears that the amount of biofilm produced after 24 h are less important for the strong mineralization. Modulation of the production of virulence factors depending on the water quality is correlated to the specific action of certain ions and iron bioavailability. In high mineralization conditions it has been shown that organic materials promote biofilm formation of *P. aeruginosa* while metallic materials tend to disadvantage it. The efficiency of a treatment sequence of a patient point of use has been validated on the 24 h biofilm model and on all materials.

- Thermal water
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Biofilm
- Mineralisation
- Materials
- Disinfection

Article soumis à une revue internationale avec comité de lecture :

Pessereau C., Garrec N., Redelberger D., Andres Y., de Bentzmann S.

Influence of water natural mineral content onto *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation abilities.

Soumis à Water Research le 18/05/2015

Communication avec acte dans un congrès international :

Pessereau C., Garrec N., Redelberger D., Andres Y., de Bentzmann S.

Influence of water mineralisation on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.

World Water congress and exhibition, Lisbonne, Portugal, 21-26 septembre 2014.

Table des matières

Liste des tableaux	vi
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	vi
Introduction	1
Première partie : Etude bibliographique	3
I. Eaux minérales naturelles : exploitation et gestion en établissements thermaux.....	4
1. Origine, définition et caractéristiques des eaux minérales naturelles.	4
2. Utilisation des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques.....	7
2.1 Historique.	7
2.2 Orientations thérapeutiques.....	8
3. Réglementation française relative à l'exploitation des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques en établissements thermaux.	8
3.1 Exigences de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle.....	9
3.2 Gestion des réseaux de distribution pour maintenir la qualité sanitaire de l'eau minérale naturelle.	13
3.2.1 Traitements de l'eau minérale naturelle.	13
3.2.2 Conception et maintenance du réseau de distribution.	13
3.2.3 Traitements du réseau de distribution.	14
3.2.3.1 Nettoyage.	14
3.2.3.2 Désinfection.	15
3.2.3.3 Actions préventives et curatives.....	16
4. Contamination microbiologique des réseaux de distribution d'eau thermale.	16
5. Données économiques.....	19
II. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1. Généralités et présentation de la bactérie.....	21
2. Ecologie et occurrence dans les réseaux d'eau.	22
3. Impact sanitaire.	25
4. Principaux facteurs de virulence.	28
4.1 Flagelle.	28
4.2 Pili.	29
4.2.1 Fimbriae ou pili de la voie chaperone-ushe.	29

4.2.2	Pili de type IV.	30
4.3	Lipopolysaccharides.	32
4.4	Exotoxines.	34
4.5	Sidérophores.	35
4.5.1	Les pyoverdines.	36
4.5.2	Les pyochélines.	37
4.6	Cas particulier des phénazines.	39
III.	Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> et implantation dans les réseaux de distribution d'eau.	40
1.	Généralités.	40
2.	Cycle de développement du biofilm.	42
2.1	Reconnaissance d'une surface.	42
2.1	Adhésion réversible.	43
2.2	Adhésion irréversible.	45
2.3	Etapes de maturation.	46
2.4	Dispersion.	48
3.	Composants caractéristiques du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	49
3.1	Les exopolysaccharides.	50
3.1.1	L'alginate.	50
3.1.2	Le Psl.	51
3.1.3	Le Pel.	52
3.2	L'ADN extracellulaire.	53
3.3	Les protéines.	54
3.4	Un biosurfactant : le rhamnolipide.	56
4.	Influence de l'environnement du réseau de distribution d'eau sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	59
4.1	Principaux systèmes de détection et de transduction du signal en réponse aux changements environnementaux.	59
4.1	Facteurs environnementaux influençant la formation de biofilm.	62
4.1.1	Concentration en nutriments disponibles.	62
4.1.1.1	Le carbone.	62
4.1.1.2	L'azote.	64
4.1.1.3	Le phosphore.	64
4.1.1.4	Le fer.	65
4.1.2	Hydrodynamique.	66

4.1.3 Matériaux constitutifs du réseau de distribution d'eau.	70
IV. Conclusion de l'étude bibliographique	73
Deuxième partie : Choix expérimentaux et expérimentations préliminaire.....	76
Introduction.	77
I. Matériel et méthodes.	79
1. Choix du panel de souches, constitution du soucier et standardisation de l'inoculum.	79
2. Caractérisation des eaux minérales naturelles embouteillées.	81
3. Tests de survie.	81
4. Courbes de croissance.	84
II. Résultats.	85
1. Caractérisation des souches.	85
2. Caractérisation des eaux minérales naturelles embouteillées.	87
3. Tests de survie.	88
4. Courbes de croissance.	91
IV. Discussion.	95
Troisième partie : Influence de la minéralisation sur la capacité de <i>P. aeruginosa</i> à former du biofilm.	98
I. Introduction.	99
II. Matériel et méthodes.	101
1. Souches et conditions de culture.	101
2. Qualité de l'eau et caractérisation de l'interférence de la flore microbienne cultivable des eaux minérales naturelles sur les essais.	101
3. Conditions de formation du biofilm et mesures de l'indice de croissance.	102
4. Suivi du développement du biofilm.	102
4.1 Marquage au cristal violet et mesures de l'indice de formation du biofilm.	102
4.2 Extraction de l'ATP et mesure de l'activité métabolique globale du biofilm.	103
5. Charge de surface : mesure du potentiel zêta.	105
6. Analyses statistiques.	106
III. Résultats.	107
1. Eaux minérales naturelles embouteillées : analyses de la flore bactérienne autochtone cultivable.	107
2. Mesure de la croissance planctonique : indice de croissance.	108
3. Mesure du développement de biofilm : indice de formation globale de biofilm.	109
4. Mesure du développement du biofilm : indice de l'activité métabolique globale.	110

5.	Liens entre le contenu minéral naturel des eaux et les paramètres bactériens mesurés : analyse en composantes principales.	111
6.	Charge de surface des cellules bactériennes : mesure du potentiel zêta.	112
IV.	Discussion.	115

Quatrième partie : Influence de la minéralisation sur les principaux mécanismes bactériens impliqués dans la formation du biofilm de *P. aeruginosa*.

I.	Introduction.	120
II.	Matériel et méthodes.	122
1.	Souches, conditions de culture et qualité des eaux minérales naturelles utilisées.	122
2.	Evaluation des capacités de mobilité.	122
2.1	Mobilité de type « swarming ».....	122
2.2	Mobilité de type « swimming ».....	122
2.3	Mobilité de type « twitching ».	123
3.	Synthèse d'exopolysaccharides.....	123
3.1	Synthèse globale : test rouge congo.	123
3.2	Expression des gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides : extraction d'ARN et qRT-PCR.	123
4.	Facteurs de virulence : mesure de la production de pyoverdine et de pyocyanine. ...	124
5.	Analyses statistiques.	125
III.	Résultats.	126
1.	Capacités de mobilité.	126
2.	Capacité de synthèse des exopolysaccharides : test rouge congo et qRT-PCR.	128
3.	Facteurs de virulence : production de pyoverdine et de pyocyanine.	129
4.	Liens entre le contenu minéral naturel des eaux et la production de pyoverdine et de pyocyanine : analyse en composantes principales.	131
IV.	Discussion.	133

Cinquième partie : Influence de la nature des matériaux sur les capacités de *P. aeruginosa* à former du biofilm et étude de l'efficacité de produits de traitements.

I.	Introduction.	139
II.	Matériel et méthodes.	143
1.	Coupons de matériaux : format et conditionnement.	143
2.	Formation du biofilm : souche et conditions de culture.....	144
3.	Etude de l'efficacité d'un traitement sur le biofilm jeune de <i>P. aeruginosa</i>	145
3.1	Séquence de nettoyage et de désinfection des coupons.	145
3.2	Etude de l'efficacité du traitement à court terme.	146

3.3	Etude de l'efficacité du traitement à long terme : recroissance après traitement.	146
4.	Etude du biofilm.....	148
4.1	Observation en microscopie électronique à balayage.	148
4.2	Marquage au cristal violet.	148
4.3	Mesure de l'activité métabolique globale au sein du biofilm : ATPmètrie.	149
4.4	Mesure de la production de facteurs de virulence : analyse de spectre.....	149
III.	Résultats.	150
1.	Etude de la capacité des matériaux à promouvoir la formation de biofilm.....	150
1.1	Mesure de la formation globale de biofilm et de l'activité métabolique globale.	150
1.2	Mesure de la production de facteurs de virulence.....	151
1.3	Observations en microscopie électronique à balayage.....	152
2.	Etude de l'efficacité d'un traitement sur le biofilm de 24 h de <i>P. aeruginosa</i>	156
2.1	Etude de l'efficacité du traitement à court terme : formation globale de biofilm et activité métabolique globale.....	156
2.1	Etude de l'efficacité du traitement à long terme : recroissance après traitement.	157
IV.	Discussion.	158
	Conclusions et Perspectives	164
	Bibliographie	170

Liste des tableaux

Tableau 1 : Limites de qualité physicochimique des eaux minérales naturelles conditionnées ou distribuées en buvette publique (arrêté du 14 mars 2007) et des eaux destinées à la consommation humaine (directive Européenne du 3 novembre 1998).....	5
Tableau 2 : Exemples de critères de classification des eaux minérales naturelles et de leurs applications thérapeutiques (Popoff, 2010 ; Petraccia <i>et al.</i> , 2006).....	6
Tableau 3 : Critères de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques en établissements thermaux : exigences de la circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000.....	11
Tableau 4 : Exemples de contaminations de réseaux de distribution d'eau thermale rapportées dans la presse grand public.....	20
Tableau 5 : Exemples d'occurrence de <i>P. aeruginosa</i> dans divers environnements hydriques.	24
Tableau 6 : Etudes mettant en évidence le rôle du réseau de distribution d'eau potable dans la transmission de <i>P. aeruginosa</i> aux patients en unités de soins intensifs.	27
Tableau 7 : Caractéristiques des principales exotoxines sécrétées par <i>P. aeruginosa</i> et de leur activité enzymatique.....	35
Tableau 8 : Récapitulatifs des principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> , impliqués dans la formation de biofilm et de leurs caractéristiques et leurs fonctions.	41
Tableau 9 : Caractéristiques des principaux types de mobilité de <i>P. aeruginosa</i> et de leurs rôles dans la formation de biofilm.	45
Tableau 10 : Principales voies de « quorum-sensing » chez <i>P. aeruginosa</i> et exemples de leurs gènes cibles.	46
Tableau 11 : Exemples d'épaisseur de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> développés en conditions semi-dynamiques dans différentes conditions de culture et analysés au microscope confocal.	47
Tableau 12 : Récapitulatif des principaux éléments constitutifs du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> et de leur fonction et leur distribution au sein du biofilm.	58
Tableau 13 : Quelques exemples des principaux systèmes permettant la transition du passage de l'état mobile à l'état adhérent chez <i>P. aeruginosa</i> en fonction des facteurs environnementaux.	61
Tableau 14 : Facteurs environnementaux influençant la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> dans les réseaux de distribution d'eaux minérales naturelles.....	69
Tableau 15 : Etudes rapportant l'influence des matériaux sur la capacité de certains microorganismes à produire du biofilm.	72

Tableau 16 : Caractéristiques physicochimiques de l'eau thermale utilisée pour les tests de survie telles qu'indiquées par l'établissement thermal.	82
Tableau 17 : Détails du panel de souches utilisé dans cette étude.	85
Tableau 18 : Résultats de la comparaison des codes VNTR des souches du panel avec ceux des souches de <i>P. aeruginosa</i> répertoriées dans la banque de donnée MLVAbank (dernière consultation le 4 septembre 2015).....	86
Tableau 19 : Caractéristiques des eaux minérales naturelles embouteillées utilisées dans cette étude.	87
Tableau 20 : T ₉₀ des populations bactériennes incubées à 37 °C ou à 14 °C en eau thermale ou en eau minérale naturelle faiblement minéralisée.	91
Tableau 21 : Description des souches isolées dans chacune des eaux minérales naturelles testées.	107
Tableau 22 : Matrice de corrélation de Pearson. Les valeurs inscrites en gras indiquent des facteurs de corrélations significativement différents de zéro entre les paramètres testés.	112
Tableau 23 : Potentiel zêta moyen (mV) de sept souches de <i>P. aeruginosa</i> selon les conditions de minéralisation ($\pm$ écart-type).	113
Tableau 24 : Matrice de corrélation de Pearson. Les valeurs inscrites en gras indiquent des facteurs de corrélations significatifs entre les paramètres testés.....	132
Tableau 25 : Catégorie de formation de biofilm et profil biologique toute minéralisation confondue pour chacune des souches du panel.	133
Tableau 26 : Spécifications règlementaires et caractéristiques de certains des matériaux utilisés dans cette étude.	144
Tableau 27 : Description des produits de la marque Ecolab® utilisés pour la séquence de nettoyage et de désinfection.	146
Tableau 28 : Protocole de déshydratation à l'éthanol des coupons. Les dilutions ont été réalisées en eau ultra-pure stérile.	148
Tableau 29 : Mesure des différents paramètres bactériens utilisés pour estimer la recroissance une semaine après traitement.	157

Liste des figures

Figure 1 : Principaux textes de lois régissant l'exploitation des eaux minérales naturelles en France.	9
Figure 2 : Diagramme de décision en cas de non-conformité d'une des analyses microbiologiques à la source ou aux points d'usage.	12
Figure 3 : Culture sur milieu PCA (plate count agar) pendant 24 h à 37 °C d'une souche de <i>P. aeruginosa</i> d'origine clinique (à gauche) et de la souche de référence PAO1 (à droite).	21
Figure 4 : Schéma des principaux éléments constitutifs d'un flagelle (MI : Membrane Interne ; ME : Membrane Externe).	28
Figure 5 : Principaux éléments constitutifs de la machinerie de synthèse des pili de type IVa chez <i>P. aeruginosa</i> (MI : membrane interne, ME : membrane externe).	31
Figure 6 : Schéma de la capture et du transport du fer par (A) la pyochéline et (B) la pyoverdine (Schalk <i>et al.</i> , 2011).	38
Figure 7 : Schéma illustrant les différentes étapes de développement d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> avec au-dessous ces mêmes étapes observées au microscope confocal avec un marquage DAPI (I à III), un marquage GFP (IV) et un marquage BacLigth® (V) (Bordi <i>et de</i> Bentzmann, 2011).	42
Figure 8 : Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm de 24 h d'une souche environnementale de <i>P. aeruginosa</i> formé sur un coupon de polychlorure de vinyle surchloré.	50
Figure 9 : Influence de la concentration en fer sur la formation de biofilm par la souche de référence PAO1 et exemples de concentration en fer de différents types d'eau (env. : environnement ; EMN : Eaux Minérales Naturelles).	66
Figure 10 : Préparation de l'inoculum : culture standardisée.	80
Figure 11 : Etapes de la réalisation des tests de survie (Emf : eau minérale naturelle faiblement minéralisée ; ET : eau thermique).	83
Figure 12 : Courbes de survie de la souche MLM en eau thermique à 37 °C et à 14 °C – dénombrement sur (A) milieu sélectif et (B) milieu non-sélectif.	89
Figure 13 : Courbes de survie de la souche MLM en eau minérale naturelle faiblement minéralisée à 37 °C et à 14 °C – dénombrement sur (A) milieu sélectif et (B) milieu non-sélectif.	90
Figure 14 : Courbes de croissance des souches du panel en milieu minimum M63 préparé en eau faiblement, moyennement ou fortement minéralisés à 37 °C sous-agitation transversale.	94
Figure 15 : Somme cumulée des concentrations en mg/L des principaux ions des eaux minérales naturelles conditionnées utilisées dans cette étude comme modèles d'eaux thermiques.	95

Figure 16 : Etapes du protocole de suivi de la formation du biofilm.....	104
Figure 17 : Système de micro-electrophorèse « Zetaphoremeter IV » (CAD instrumentations, France).....	105
Figure 18 : Indice de croissance planctonique des souches de <i>P. aeruginosa</i> . Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. ICm correspond à la moyenne des indices de croissance toute minéralisation confondue.	108
Figure 19 : Indice de formation globale de biofilm des souches de <i>P. aeruginosa</i> . Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. IBm correspond à la moyenne des mesures d'indices de formation globale de biofilm toute minéralisation confondue.	109
Figure 20 : Gammes étalon des deux campagnes d'essais de mesure de l'activité métabolique globale (RLU : unités relatives de lumière). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.	110
Figure 21 : Activité métabolique globale au sein du biofilm des souches de <i>P. aeruginosa</i> . Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. IAMB correspond à l'activité métabolique globale au sein des biofilms d'une souche toute minéralisation confondue.	111
Figure 22 : Potentiel zêta des souches PAO1 et ST111 en condition de minéralisation forte. Distribution du nombre de cellules bactériennes selon leur potentiel zêta (22.a : PAO1 et 22.c : ST111). Trajectoires de migration des cellules bactériennes (22.b : PAO1 et 22.d : ST111).	114
Figure 23 : Zone de migration des souches ST111 et E6 présentant des capacités de mobilité opposées selon d'une part le type de mobilité, indiqué en haut de la figure, et d'autre part la condition de minéralisation spécifiée à gauche de la figure.....	126
Figure 24 : Evaluation des capacités de mobilité des souches de <i>P. aeruginosa</i> : taille de la zone de migration sur des milieux spécifiques à chacune des mobilités de type « swarming » (sa), « swimming » (si) ou « twitching » (tw) selon la condition de minéralisation. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.	127
Figure 25 : Influence du contenu minéral naturel des eaux testées sur la production d'exopolysaccharides des souches ST111, D1, et E1 (A) à l'échelle phénotypique globale et (B) à l'échelle transcriptomique par évaluation du niveau d'expression des gènes <i>algU</i> , <i>pelB</i> et <i>pslA</i>	129
Figure 26 : Influence du contenu minéral naturel des eaux sur (A) la production de pyoverdine par mesure de l'absorbance à 400 nm et (B) la production de pyocyanine par mesure de l'absorbance à 691 nm. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.	131
Figure 27 : Surnageants des souches ST111 et PAO1 obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en condition de minéralisation faible, moyenne ou forte : (A) pigmentation naturelle et (B) fluorescence sous UV.....	131
Figure 28 : Cotes des coupons rectangulaires (PVC-C) et des coupons circulaires utilisés dans cette étude.....	143
Figure 29 : Coupon de PVC-C incubé dans un pot de prélèvement contenant 30 mL de milieu M63Fensemencé à partir d'une culture de la souche ST111.	145

Figure 30 : Etapes du protocole utilisé pour étudier l'influence de la nature des matériaux sur la capacité de la souche ST111 à former du biofilm et sur l'efficacité d'une séquence de traitement.....	147
Figure 31: Influence de la nature des matériaux sur le biofilm de 24 h de la souche ST111 en milieu M63F : (A) mesure de la formation globale de biofilm et (B) mesure de l'activité métabolique globale au sein des biofilms.	151
Figure 32 : Influence de la nature des matériaux sur la capacité de la souche ST111 à produire de la pyoverdine après 24 h d'incubation à 30 °C en milieu M63F.....	151
Figure 33 : Observation en microscope électronique à balayage de la surface des matériaux nus (de haut en bas : Colonne de gauche: cuivre, laiton et inox 316 L ; colonne de droite : PE, PVC-C et EPDM).....	153
Figure 34 A : Observation en microscopie électronique à balayage des biofilms de la souche ST111 développés sur les coupons de matériaux (colonne de gauche matériau + M63F, colonne de droite matériau + M63F + souche ST111 ; de haut en bas : cuivre, laiton, inox 316 L)...	154
Figure 35 B :: Observation en microscopie électronique à balayage des biofilms de la souche ST111 développés sur les coupons de matériaux (colonne de gauche matériau + M63F, colonne de droite matériau + M63F + ST111) (de haut en bas : PE, PVCC et EPDM).....	155
Figure 36 : Etude de l'efficacité de la séquence de nettoyage et de désinfection sur le biofilm de 24 h de la souche ST111 développé en milieu M63F : (A) mesure du biofilm globale et (B) mesure de l'activité globale au sein du biofilm.....	156
Figure 37 : Observation en microscopie électronique à balayage d'une colonie de ST111 développée sur la surface d'un coupon PE après 24 h d'incubation à 30 °C en M63F.	161

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNe : ADN extracellulaire
ANOVA : Analyse de variance
ARN : Acide Ribonucléique
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine Triphosphate
c-di GMP : diguanylate monophosphate cyclique
CPA : Common Polysaccharide Antigen
CSTB : Centre Scientifique et Technique du Batiment
CU : Chaperone-Usher
CUP : Chaperone-Usher Pathway
CV : Cristal Violet
DGC : Diguanylate Cyclase
DGS : Direction Générale de la Santé
DLVO : Théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek
DO : Densité Optique
EMN : Eau Minérale Naturelle
EPDM : éthylène-propylène-diène monomère
EPS : Substances exopolymériques
ET : Eau Thermale
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IAMB : Indice de l'Activité Métabolique globale au sein du Biofilm
IB : Indice de formation de Biofilm
IC : Indice de Croissance
ICP – MS : Spectrométrie de masse à couplage inductif
Inox : Acier Inoxydable
LB : Luria Broth
LPS : Lipopolysaccharide
MEB : Microscope Electronique à Balayage
MEC : Matrice Extracellulaire
MLVA : Multiple Locus Variable number of tandem repeat Analysis
NEP : Nettoyage En Place

NO : Oxyde Nitrique
OSA : O-Specific Antigen
PAMP : Pattern Associated Molecular Pattern
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCA : Plate Count Agar
PCH : Pyochéline
PCN : Pyocyanine
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PDE : Phosphodiesterase
PE : Polyéthylène
PEL : PELlicle locus
PP : Polypropylène
PQS : Pseudomonas Quinolone Signal
PSL : Polysaccharide Synthesis Locus
PVC : Polychlorure de Vinyle
PVCC : Polychlorure de Vinyle surchloré
PVD : Pyoverdine
PVDF : Polyfluorure de vinylidène
QS : Quorum Sensing
Re : Nombre de Reynolds
RLU : Unité Relative de Lumière
ROS : Reactive Oxygen Species
TAD : Tight Adherence
TCS : Two-Component System
TLR : Toll-Like Receptor
UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultra-Violet
VBNC : Viable But Not Culturable
VDW : Van Der Waals
VNTR : Variable Number of Tandem Repeat

Introduction

Les eaux minérales naturelles se distinguent de l'eau potable par leur contenu minéral spécifique et sont réglementairement définies comme des eaux microbiologiquement saines. Leur composition spécifique est à l'origine de leur utilisation à des fins thérapeutiques sous contrôle médical en établissements thermaux. Du fait de cette utilisation, de certains de leurs modes d'administration et de la potentielle altération de la santé des curistes, ces eaux doivent être exemptes de microorganismes pathogènes. L'utilisation des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques est soumise à une réglementation très stricte imposant l'absence de microorganismes pathogènes à l'émergence et aux points d'usage. Cette réglementation n'autorise qu'un nombre restreint de procédés de traitement de l'eau et exclue le recours à un désinfectant en concentration résiduelle tel que le chlore dans l'eau potable. Les contaminations microbiologiques peuvent être sanctionnées administrativement par la fermeture du point d'usage concerné ou de la totalité de l'établissement suivant les cas, entraînant des pertes économiques considérables pour l'établissement thermal et l'économie locale associée à l'activité thermale.

Malgré la mise en place de protocoles de nettoyage et de désinfection répondant aux exigences réglementaires, les établissements thermaux sont régulièrement confrontés à des problèmes de contaminations microbiologiques de leur réseau de distribution. Un rapport de la Direction Générale de la Santé indique que pendant la saison thermale 2001, plus de 80 % des établissements thermaux français ont été contaminés au moins une fois par un agent pathogène. Plus des deux tiers de ces contaminations étaient dues à *Pseudomonas aeruginosa* (DGS, 2005). La récurrence et la persistance de ces contaminations sont attribuées à la capacité de la bactérie à s'implanter sous forme de biofilm. Cette forme adhérente, à l'organisation complexe, augmente les propriétés de résistance naturelles de *P. aeruginosa* aux attaques chimiques, mécaniques et thermiques, rendant son élimination d'autant plus difficile. La formation et le développement de ce biofilm sont dépendants des conditions environnementales et peuvent à ce titre être influencés par la qualité de l'eau circulante, par certains éléments constitutifs du réseau de distribution et par l'exposition à des produits de traitements.

En dépit des difficultés d'élimination et de l'impact économique associé, peu de données relatives aux contaminations des réseaux de distribution d'eau thermale par *P. aeruginosa* sont disponibles dans la littérature scientifique. L'objectif de ces travaux de thèse est donc d'apporter des éléments de compréhension sur l'implantation dans les réseaux de distribution d'eau thermale de *P. aeruginosa* selon l'origine des souches, la minéralisation des eaux et les matériaux constitutifs des réseaux. De plus, une attention particulière sera apportée sur

l'efficacité des pratiques de nettoyage et de désinfection couramment mises en œuvre sur différents matériaux.

Ce manuscrit se divise en 5 parties. La première est dédiée à l'étude bibliographique et comprend trois sections. La première section présente les eaux minérales naturelles, leur utilisation à des fins thérapeutiques et la gestion des réseaux de distribution d'eau thermique. Elle expose également les problèmes de contamination microbiologique des réseaux auxquels sont confrontés les établissements thermaux et l'importance de *P. aeruginosa* dans ces contaminations. La deuxième section est dédiée à la présentation de *P. aeruginosa*, et de ses facultés de survie, d'adaptation et de virulence. Elle présente les capacités de persistance de la bactérie dans l'environnement, et plus particulièrement dans les réseaux de distribution d'eau potable. La troisième section est consacrée à l'implantation de la bactérie sous forme de biofilm dans les réseaux de distribution d'eau. Elle détaille également sa composition, ses propriétés, son développement ainsi que les principaux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la formation du biofilm.

La deuxième partie présente les choix expérimentaux et les expérimentations préliminaires qui ont permis de confirmer certains choix méthodologiques.

La troisième partie se focalise sur l'influence de la composition minérale des eaux sur les capacités de *P. aeruginosa* à former du biofilm.

La quatrième partie s'intéresse à l'influence de la composition minérale des eaux sur les principaux mécanismes bactériens impliqués dans la formation du biofilm de 24 h, tels que la mobilité, la synthèse d'exopolysaccharides et la production de facteurs de virulence.

La cinquième partie explore la capacité d'une souche de *P. aeruginosa* à développer, en condition de minéralisation élevée, un biofilm sur différents matériaux constitutifs des réseaux de distribution et des postes de soins. Enfin, l'efficacité d'une séquence de nettoyage et de désinfection sur ces biofilms a été étudiée.

A partir des résultats obtenus, des conclusions sont proposées afin d'envisager des solutions opérationnelles applicables pour un meilleur suivi des installations et d'ouvrir de nouvelles voies d'investigation afin de mieux comprendre les mécanismes d'implantation de germes potentiellement pathogènes dans les réseaux d'eau.

Première partie :
Etude bibliographique

I. Eaux minérales naturelles : exploitation et gestion en établissements thermaux.

1. Origine, définition et caractéristiques des eaux minérales naturelles.

Les eaux minérales naturelles proviennent de l'infiltration des eaux de pluie et des eaux issues de la fonte des neiges dans les fractures du sol et les roches calcaires perméables jusqu'aux couches secondaires plus profondes où elles s'accumulent. La chaleur provenant de l'écorce terrestre repousse vers la surface les eaux qui se chargent en différents composants provenant des couches géologiques traversées. Elles émergent ensuite à la surface, en un ou plusieurs endroits, par les fissures de la roche et les failles du terrain. Leur température varie selon leur parcours et leur rencontre avec des eaux de surfaces froides (Boisseuil, 2002). A l'origine l'adjectif « thermale » faisait référence à la température des eaux employées pour les soins. De nos jours, il désigne de façon plus générale les eaux minérales naturelles pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques dans les stations et les établissements thermaux (Popoff, 2010).

Les eaux minérales naturelles sont règlementairement définies comme « des eaux microbiologiquement saines [...] provenant d'une nappe ou d'un gisement souterrain exploité à partir d'une ou plusieurs émergences naturelles ou forées constituant la source » (décret n° 2007-49 du 11 janvier 2007). Cette définition ne fait pas de distinction entre les eaux minérales naturelles embouteillées et les eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques, une même eau pouvant faire simultanément l'objet de ces deux types d'exploitation (Popoff, 2010). Bien que « microbiologiquement saines », les eaux minérales naturelles ne sont pas stériles. Elles comprennent une flore bactérienne autochtone généralement constituée d'un faible nombre d'individus et principalement représentée par les genres *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Cornybacterium*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Paucimonas*, *Pseudomonas* (fluorescents et non fluorescents) et *Stenotrophomonas* (Casanovas-Massana et Blanch, 2012 ; Schmidt-Lorenz, 1976).

Les eaux minérales naturelles se distinguent de l'eau potable par leur contenu caractéristique en sels minéraux et leur concentration en éléments traces. Des limites de qualité physico-chimique des eaux minérales naturelles conditionnées ou distribuées en buvette publique ont été fixées par l'arrêté du 14 mars 2007. Ces limites établissent les concentrations

maximales de constituants naturellement présents dans les eaux minérales dont le dépassement peut présenter un risque pour la santé, tels que l'arsenic, les cyanures ou le mercure (tableau 1).

Tableau 1 : Limites de qualité physicochimique des eaux minérales naturelles conditionnées ou distribuées en buvette publique (arrêté du 14 mars 2007) et des eaux destinées à la consommation humaine (directive Européenne du 3 novembre 1998).

Paramètres physicochimiques	Concentration maximale à ne pas dépasser (µg/L)	
	Eaux minérales naturelles (arrêté du 14 mars 2007)	Eaux destinées à la consommation humaine (directive 98/83/CE)
Antimoine	5	5
Arsenic total	10	10
Baryum	1 000	ni
Cadmium	3	5
Chrome	50	50
Cuivre	1 000	2 000
Cyanures	70	50
Fluorures	5 000	1 500
Plomb	10	10
Manganèse	500	50
Mercure	1	1
Nickel	20	20
Nitrates	50 000	50 000
Nitrites	100	500
Sélénium	10	10

ni : non-indiqué

L'adoption d'un système de classification international des eaux minérales naturelles est ardue du fait de la diversité des contenus minéraux liée aux paramètres physicochimiques propres aux couches géologiques infiltrées et aux processus géochimiques subis (Diduch *et al.*, 2011). Certains paramètres couramment employés pour caractériser ces eaux sont présentés par Diduch *et al.* (2011) et incluent aussi bien la température d'émergence, le point de congélation, le résidu sec à 180 °C, les ions prédominants que l'activité biologique associée à ces eaux (tableau 2). Dans les établissements thermaux, les eaux minérales naturelles peuvent faire l'objet d'utilisations thérapeutiques sous contrôle médical. Leurs applications dépendent de leur composition (tableau 2) et peuvent prendre diverses formes, telles que l'ingestion, l'inhalation, les bains et les douches ou les boues (Petraccia *et al.*, 2006).

Tableau 2 : Exemples de critères de classification des eaux minérales naturelles et de leurs applications thérapeutiques (Popoff, 2010 ; Petraccia *et al.*, 2006).

Critère	Dénomination	Applications thérapeutiques
Température d'émergence	Eau froide : < 20 °C	-
	Eau thermale : > 20 °C tépide : 20 à 30 °C chaude : 30 à 40 °C très chaude : > 40 °C	-
Minéralisation totale ou Résidu sec à 180 °C (mg/L)	Très faiblement minéralisée : < 50 mg/L	Effet diurétique, recommandée contre les calculs urinaires
	Faiblement minéralisée : 50 à 500 mg/L	Effet diurétique, recommandée contre les calculs urinaires et l'inflammation des articulations
	Moyennement minéralisée : 500 à 1 000 mg/L	-
	Minéralisée : 1 000 à 1 500 mg/L	-
	Fortement minéralisée/riche en sels minéraux : > 1 500 mg/L	-
Ions en concentrations prédominantes	Eau sulfurée : présence de soufre sous plusieurs états d'oxydation à des concentrations comprises entre 0,3 mg/L et 150 mg/L	Recommandée sous forme de bain ou d'inhalation contre les affections du système respiratoire et certaines pathologies dermatologiques
	Eau sulfatée : sulfates combinés au calcium et au magnésium des couches géologiques profondes en concentration supérieure à 200 mg/L	Stimule le péristaltisme intestinal, recommandée contre la constipation chronique primitive, les troubles urinaires et les maladies métaboliques
	Eau chlorurée sodique: chlorure combiné au sodium en concentration supérieure à 200 mg/L	Stimule le péristaltisme intestinal, recommandée contre la constipation chronique primitive, le syndrome du côlon irritable, les pathologies biliaires et les rhumatismes
	Eau naturellement gazeuse : concentration en dioxyde de carbone supérieure à 250 mg/L et concentration en hydrogénocarbonate supérieure à 1 000 mg/L	-
	Eau ferrugineuse : concentration en fer ferreux (Fe ²⁺) comprise entre 0,5 et 20 mg/L	Recommandée contre l'anémie et l'hypertyroïdisme
	Eau bicarbonatée : concentration en bicarbonate supérieure à 600 mg/L	Neutralise les sécrétions gastriques acides, recommandée contre le reflux gastro-œsophagien et l'hypersécrétion hydrochlorique
	Eau calcique : concentration en calcium supérieure à 150 mg/L	Prévient l'hypertension, recommandée quand les besoins en calcium augmentent (ex. : chez les enfants, les femmes enceintes, les femmes ménopausées ou les personnes âgées) et contre l'ostéoporose
	Eau magnésienne : concentration en magnésium supérieure à 50 mg/L	Prévient l'athérosclérose, recommandée contre les pathologies gynécologiques/obstétriques.
	Eau fluorée ou contenant du fluor : concentration en fluor supérieure à 1 mg/L	-

2. Utilisation des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques.

2.1 Historique.

L'utilisation des eaux minérales naturelles à des fins récréatives ou thérapeutiques remonte à l'antiquité. Ainsi, les étrusques exploitaient la source de Piano Dei Bagno, dans la localité actuelle de Bagni Caldi en Toscane, pour ses propriétés bénéfiques pour la santé (Petraccia *et al.*, 2006) et de nombreuses stations thermales actuelles sont érigées à l'emplacement d'anciens thermes romains tels que les stations de Nérès-les-Bains, Luxeuil-les-Bains, Bourbonne-les-Bains ou Aix-les-Bains (Jazé-Charvolin, 2014).

En France, l'activité thermale connaît un tournant au cours du 18^{ème} siècle, marqué par l'amélioration des installations existantes et la création d'établissements thermaux fonctionnels et structurés comprenant des piscines. Au 19^{ème} siècle, le thermalisme est en plein essor avec l'apparition de nouvelles destinations thermales à l'image d'Enghien-les-Bains en 1820 ou d'Evian en 1827 et de nouveaux modes d'utilisation de l'eau thermale : aux traditionnels bains viennent s'ajouter l'inhalation et la boisson (Jazé-Charvolin, 2014). Dans l'entre-deux guerres, l'activité thermale s'épanouit autour de deux activités complémentaires, le thermalisme et le tourisme. Les stations thermales sont alors des lieux de cures et de villégiature permettant de profiter des bienfaits de l'eau thermale et des activités culturelles et mondaines de l'époque. Les stations étaient alors ouvertes cinq mois dans l'année entre mai et septembre, la saison thermale étant concentrée sur les mois de juillet et août (Victor *et al.*, 2011). L'utilisation des eaux thermales à des fins thérapeutiques devient significative à la fin de la seconde guerre mondiale (Jazé-Charvolin, 2014), elle est prise en charge par la sécurité sociale à partir de 1950 (Victor *et al.*, 2011). Une dépendance aux soins remboursés se met alors petit à petit en place. En 1960, les curistes assurés sociaux sont plus nombreux que les curistes libres à fréquenter les thermes, l'activité thermale se restreint de plus en plus à sa dimension thérapeutique. Le nombre de curistes conventionnés triple entre 1952 et 1985, passant de près de 250 000 à plus de 600 000 curistes, puis stagne entre 1985 et 1992. Les établissements thermaux, pâtissant d'une image vieillissante, voient alors leur fréquentation fortement diminuer : ils perdent près de 100 000 curistes entre 1992 et 2006 soit 18 % de leur effectif initial. Face à cette crise, les instituts sont amenés à se moderniser notamment en élargissant leur prestation à la balnéothérapie et aux activités thermoludiques et/ou en favorisant le tourisme patrimonial (Victor *et al.*, 2011, Jazé-Charvolin, 2014). L'utilisation des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques restent cependant le fondement de l'activité des établissements thermaux.

2.2 Orientations thérapeutiques.

Aux Etats-Unis, les eaux minérales naturelles sont majoritairement employées à des fins esthétiques (perte de poids, « rajeunissement », tonus) ou relaxantes (Lund, 1996) tandis qu'en Europe et au Japon ces eaux sont principalement utilisées à des fins thérapeutiques (Bottoni *et al.*, 2013). Près de 70 % du territoire Hongrois comprend des sources thermales (Tonko *et al.*, 2013) en partie concentrées sur la ville de Budapest, surnommée la citée des bains, et notamment recommandées contre l'arthrite, les rhumatismes, les problèmes cardiovasculaires, l'asthme, les bronchites ou la neurasthénie (Bottoni *et al.*, 2013). Le Japon compte plus de 27 000 sources d'eaux minérales naturelles principalement utilisées contre les douleurs musculaires et articulaires, les affections dermatologiques, les troubles neurologiques ou gynécologiques et la fatigue liée au surmenage ou à la maladie. Certaines de ces sources sont plus particulièrement dédiées à une application thérapeutique précise : les sources Shima, Yunohira et Gaga sont les trois sources les plus connues pour soulager les troubles gastro-intestinaux (Serbulea et Payyappallimana, 2012).

L'utilisation thérapeutique des eaux minérales naturelles dépend de leur composition (tableau 2). Les eaux sulfurées sont ainsi recommandées contre les troubles respiratoires et les affections dermatologiques, les eaux sulfatées contre les troubles du système urinaire et les maladies métaboliques, et les eaux chlorurées sodiques contre les problèmes rhumatologiques (Popoff, 2010). En France, la sécurité sociale décrit douze orientations thérapeutiques : la rhumatologie, les voies respiratoires, la phlébologie, les voies digestives et métaboliques, la gynécologie et les maladies de l'appareil génital, les affections des muqueuses bucco-linguales, la dermatologie, les maladies des voies urinaires et métaboliques, le traitement des affections psychosomatiques, les troubles du développement chez l'enfant, les maladies cardiovasculaires et la neurologie (Sécurité sociale, 2008).

3. Règlementation française relative à l'exploitation des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques en établissements thermaux.

En France, l'exploitation de l'eau minérale naturelle est soumise à réglementation (figure 1). Certains textes de loi sont communs aux eaux minérales naturelles destinées à l'industrie de l'embouteillage et à celles utilisées à des fins thérapeutiques en établissements thermaux. L'exploitation d'une source d'eau minérale, quelle que soit son utilisation finale, est soumise à l'arrêté du 5 mars 2007 relatif à la constitution du dossier de demande d'autorisation d'exploitation (Ministère de la santé et des solidarités, 2007). La définition et les principales caractéristiques des eaux minérales naturelles sont détaillées dans un chapitre du décret n°

2007-49 du 11 janvier 2007 relatif à la sécurité sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine. Ce chapitre est « applicable à l'exploitation des eaux minérales naturelles pour le conditionnement de l'eau ou son importation sous forme conditionnée, l'utilisation à des fins thérapeutiques dans un établissement thermal de l'eau et de ses produits dérivés, et la distribution en buvette publique de l'eau en dehors du cadre d'une cure thermique ». Il précise notamment que les limites de qualité microbiologique et physicochimique des eaux minérales naturelles sont définies par arrêté du ministre chargé de la santé. L'arrêté du 14 mars 2007 fixe ainsi les critères de qualité des eaux conditionnées, les traitements et les mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique.

Certains textes de lois sont spécifiques à l'utilisation des eaux minérales naturelles. Les eaux minérales naturelles destinées à l'embouteillage répondent à la directive européenne 2009/54/CE, relative à l'exploitation et la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles. Elle n'est pas applicable « aux eaux minérales naturelles utilisées à des fins curatives [...] dans les établissements thermaux ou hydrominéraux ». Ces eaux sont soumises à la circulaire de la Direction Générale de la Santé DGS/VS 4 N° 2000-336 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux (DGS, 2000) et à l'arrêté du 27 février 2007 relatif aux traitements de l'eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques dans les établissements thermaux (Ministère de la santé et des solidarités, arrêté du 27 février 2007).

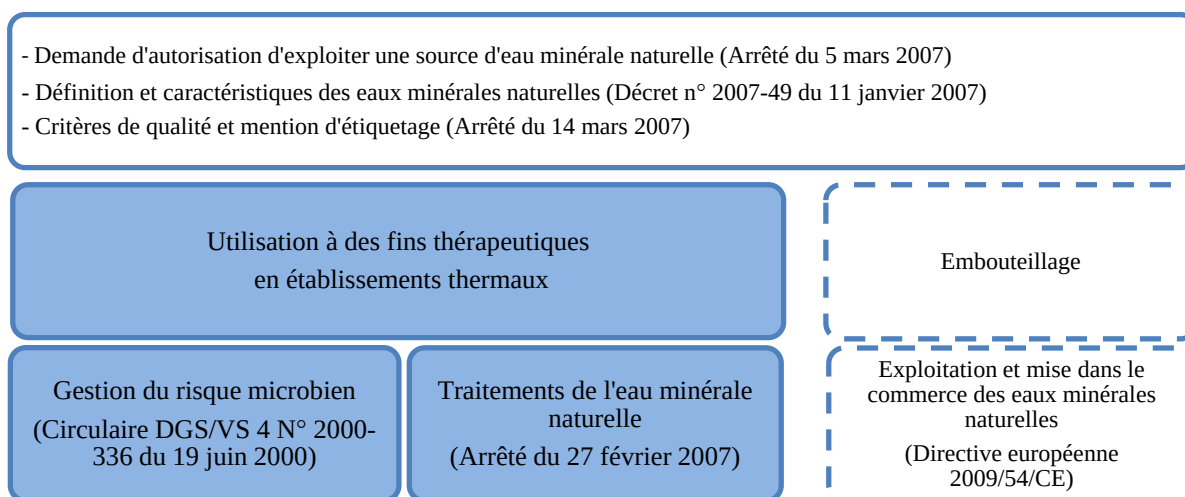


Figure 1 : Principaux textes de lois régissant l'exploitation des eaux minérales naturelles en France.

3.1 Exigences de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle.

En raison de leurs usages thérapeutiques, de leurs modes d'administration et de l'état de santé des populations exposées, les eaux minérales naturelles se doivent d'être exemptes de microorganismes pathogènes de l'émergence aux points d'usage. Les analyses

microbiologiques pratiquées sont distinguées selon deux catégories, les analyses de type BMO et de type BM1, suivant les microorganismes concernés. Les analyses BMO concernent le dénombrement des microorganismes revivifiants à 36 ± 2 °C après 44 ± 4 h et à 22 ± 2 °C après 68 ± 4 h dans un échantillon contrôle de 1 mL, le dénombrement des germes anaérobies sporulés sulfito-réducteurs dans un échantillon contrôle de 50 mL et le dénombrement des coliformes totaux à 37 °C, des coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*) à 44,5 °C, des streptocoques fécaux et de *P. aeruginosa* dans un échantillon contrôle de 250 mL. Les analyses BM1 concernent le dénombrement de *Legionella pneumophila* dans un échantillon contrôle d'un litre (DGS, 2000).

Le dénombrement de la flore revivifiable sert d'indicateur de contamination de l'eau minérale naturelle : la concentration initialement mesurée à l'émergence ne doit pas augmenter au cours de l'exploitation. La présence d'*Escherichia coli*, de *Legionella pneumophila* ou de *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas tolérée : la qualité microbiologiques des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques en établissements thermaux répond à des exigences strictes de « tolérance zéro ».

La fréquence de ces analyses microbiologiques dépend du type de soins auquel le point d'usage est dédié (tableau 3). Les soins sont ainsi distingués selon leur risque sanitaire en quatre catégories (Ministère de la santé et des solidarités, arrêté du 27 février 2007) :

- les soins de type I concernent les soins au contact direct ou susceptibles de provoquer un contact direct avec les muqueuses respiratoires tels que les inhalations.
- les soins de type II regroupent les soins au contact avec les autres muqueuses internes et nécessitant l'ingestion d'eau minérale.
- les soins de type III concernent les soins externes individuels tels que les soins prodigués en bain ou en douche individuel.
- les soins de type IV concernent les soins externes collectifs tels que les soins prodigués en piscine thermale ou piscine de déambulation.

Tableau 3 : Critères de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques en établissements thermaux : exigences de la circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000.

Microorganisme recherché	Type d'analyses	Volume du prélèvement contrôle (mL)	Valeurs impératives		Fréquence minimum des prélèvements contrôles	
			à l'émergence	aux points d'usage	à l'émergence et à la source	aux points d'usage
Coliformes	BMO	250	absence	absence		
Coliformes thermotolérants / <i>E. coli</i>	BMO	250	absence	absence	établissements ouverts moins de 7 mois/an : trois analyses BMO et BM1/an dont une avant l'ouverture	dédiés aux soins de type I* : au moins une analyse BMO et BM1/mois
Streptocoques fécaux	BMO	250	absence	absence		
<i>P. aeruginosa</i>	BMO	250	absence	absence	établissements ouverts plus de 7 mois/an : quatre analyses BMO et BM1/an dont une avant l'ouverture	dédiés aux soins de types II*, III* et IV* : au moins une analyse BMO/mois et une analyse BM1 trimestrielle
Anaérobies sporulés sulfito-réducteurs	BMO	50	absence	absence		
<i>Legionella</i> / <i>L. pneumophila</i>	BM1	1 000	inférieur au seuil de détection de la méthode	inférieur au seuil de détection de la méthode		

* soins de type I : soins au contact direct ou susceptible de provoquer un contact direct avec les muqueuses oculaires et respiratoires.
soins de types II : soins au contact avec les autres muqueuses internes et nécessitant l'ingestion d'eau minérale naturelle.
soins de type III : soins externes individuels.
soins de type IV : soins externes collectifs.

Les mesures prises en cas de non-conformité des analyses microbiologiques diffèrent selon que la source ou le point d'usage soit concerné (figure 2), et dans le cas de ce dernier selon le type de soins auquel il est dédié (DGS, 2000).

Un prélèvement positif à la source conduit le laboratoire agréé ayant effectué l'analyse à en informer l'autorité sanitaire compétente qui fera procéder à de nouveaux prélèvements. Si le résultat positif n'est pas confirmé, un suivi renforcé de la qualité de l'eau est tout de même mis en place. Si le résultat positif est confirmé, l'exploitation de la source doit être immédiatement suspendue, elle ne peut reprendre que lorsque deux résultats négatifs ont été obtenus à une semaine d'intervalle (DGS, 2000). Un prélèvement positif au point d'usage entraîne la mise en place de mesures curatives nécessaires à la suppression de la contamination telles que l'application de protocoles de nettoyage et de désinfection. L'information doit être transmise au corps médical de l'établissement thermal et les protocoles de maintenance, d'entretien et de désinfection des réseaux de distribution doivent être transmis à l'autorité sanitaire compétente. La contamination de points d'usage dédiés aux soins de type I entraîne leur fermeture immédiate tandis que les points d'usage dédiés aux soins de type II, III et IV restent en fonctionnement, à la condition qu'une deuxième série d'analyses soit effectuée sur ces points et sur une zone proche de ces points. Si ces deuxièmes analyses sont négatives le point d'usage incriminé reste en fonctionnement. Si elles sont positives, le point d'usage est immédiatement fermé. Tout point d'usage fermé suite à une contamination peut être rouvert à la seule condition

que les deux analyses effectuées respectivement 3 jours et 5 jours après l'application des protocoles de nettoyage, de désinfection et de rinçage soient négatives (DGS, 2000).

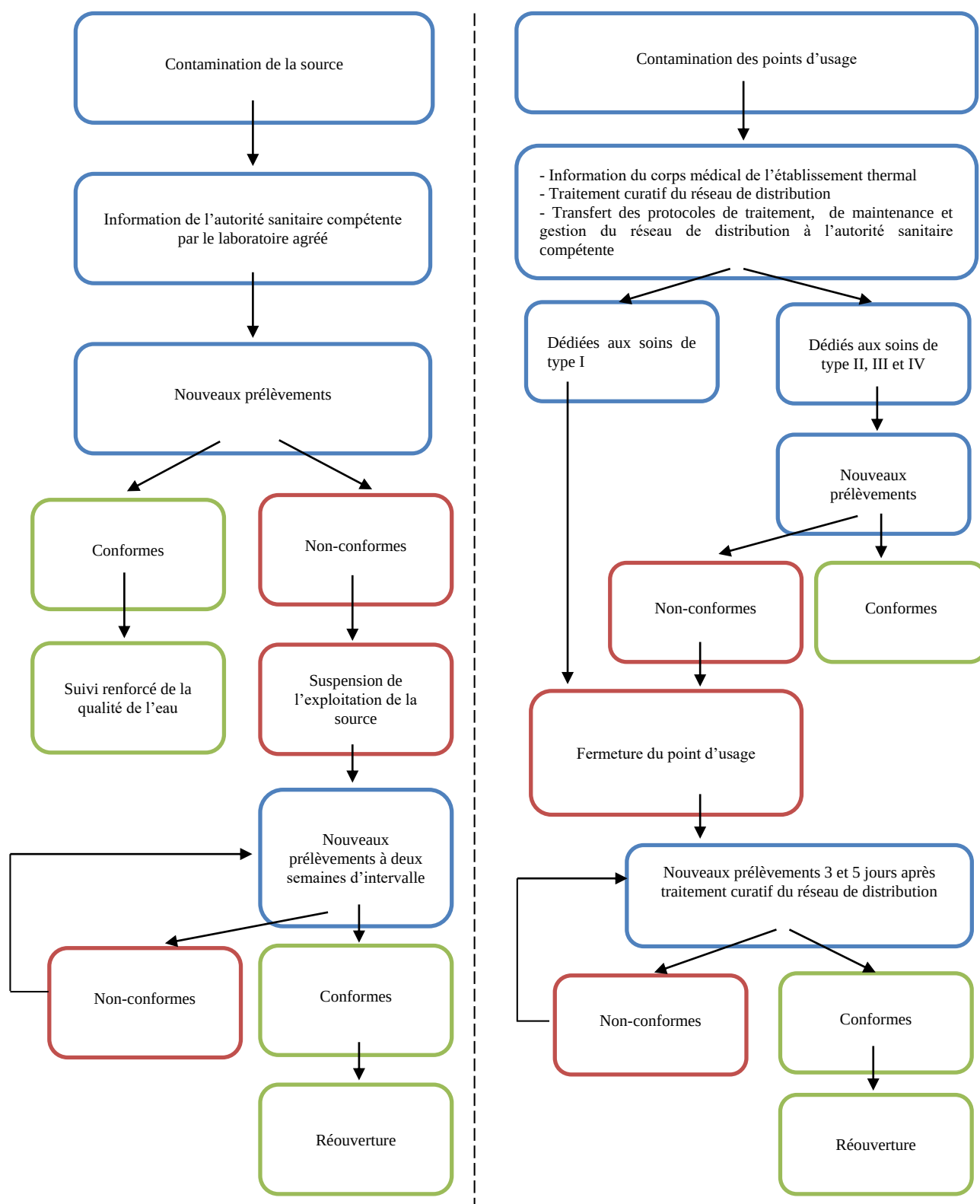


Figure 2 : Diagramme de décision en cas de non-conformité d'une des analyses microbiologiques à la source ou aux points d'usage.

3.2 Gestion des réseaux de distribution pour maintenir la qualité sanitaire de l'eau minérale naturelle.

3.2.1 Traitements de l'eau minérale naturelle.

Dans le cadre d'une eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques dans un établissement thermal, les traitements et les adjonctions autorisés par la réglementation française sont restreints à la séparation d'éléments instables, tels que les composés du fer, du soufre, du manganèse et de l'arsenic par décantation et filtration, l'élimination du gaz carbonique par des procédés physiques, l'incorporation ou la réincorporation de gaz carbonique et la désinfection visant à prévenir les risques sanitaires spécifiques à certains soins (Ministère de la santé et des solidarités, arrêté du 27 février 2007). Des traitements de l'eau par irradiation aux ultraviolets (UV), filtration membranaire et pasteurisation flash suivi d'un refroidissement sont autorisés en amont immédiat des points d'usage destinés aux soins au contact des muqueuses internes (soins de type I et II). Le traitement de l'eau utilisée pour les soins externes individuels (soins de type III) peut être réalisé par irradiation UV en amont immédiat du point d'usage ou par filtration en amont du point d'usage. L'eau utilisée pour les soins externes collectifs (soins de type IV) peut être traitée suivant les traitements autorisés pour les eaux de piscine selon l'article L. 1332-1 du code de la santé publique (Ministère de la santé et des solidarités, arrêté du 27 février 2007).

3.2.2 Conception et maintenance du réseau de distribution.

Le décret n° 2007-49 du 11 janvier 2007 précise que les matériaux constituant le réseau de distribution doivent être compatibles avec la composition de l'eau minérale naturelle de façon à empêcher toute altération chimique, physicochimique, microbiologique et organoleptique de la qualité de l'eau telle qu'elle se présente à l'émergence. Les matériaux utilisés dans la conception de la partie principale des réseaux de distribution d'eau minérale naturelle sont essentiellement représentés par la fonte ancienne dans le cas de réseaux dits anciens et la fonte ductile¹, l'acier galvanisé, le cuivre, l'acier inoxydable 304 L ou 316 L, le propylène, le polychlorure de vinyle (PVC) et le polypropylène (PP) dans le cas de réseaux dits récents (DGS, 2000). D'autres matériaux sont susceptibles d'être retrouvés dans la conception et le raccord des différents éléments de robinetterie tels que du laiton, du polyéthylène (PE), du polyfluorure de vinylidène (PVDF) ou des élastomères.

¹ La fonte ductile est composée d'un alliage de fer, de carbone et de silicium lui procurant une résistance mécanique aux ruptures et aux chocs plus élevée que celle de la fonte ancienne.

La limitation des risques microbiologiques est en partie dépendante de la conception des réseaux de distribution d'eau. Il est primordial d'assurer une bonne circulation de l'eau dans le réseau de distribution de façon à limiter l'existence de zones de stagnation, tels que des bras morts, susceptibles de favoriser le développement de microorganismes. L'adaptation entre conception du réseau et procédures de nettoyage et de désinfection est également indispensable. La simplification des opérations de rinçage, suite au nettoyage et à la désinfection du réseau, par l'installation de vannes permettant l'isolement de tronçons précis et l'utilisation de matériaux compatibles avec les produits de traitement utilisés facilitent l'entretien des réseaux de distribution et le maintien de la qualité microbiologique des eaux minérales naturelles (DGS, 2000).

3.2.3 Traitements du réseau de distribution.

Le maintien de la qualité microbiologique d'un réseau de distribution d'eau thermique est notamment assuré par l'application de traitements de nettoyage et de désinfection. L'étape de nettoyage permet l'élimination des dépôts constitués d'incrustations de minéraux. Ces dépôts peuvent comprendre une partie organique, composée de la flore autochtone des eaux minérales naturelles, adhérente à leur surface sous une forme d'implantation appelée biofilm. Le biofilm est communément défini comme des populations de microorganismes adhérentes à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire d'une matrice extracellulaire autoproduite (Costerton *et al.*, 1995). Les opérations de nettoyage ne suffisent pas toujours à éliminer totalement le biofilm présent, c'est pourquoi elles sont suivies d'opérations de désinfection. Ces opérations de nettoyage et de désinfection peuvent être réalisées en eau minérale si la qualité microbiologique et la composition de celle-ci le permettent. Aux eaux minérales sulfurées, gazeuses ou ferrugineuses, susceptibles d'interagir avec les substances désinfectantes, est préférée l'utilisation d'eau potable du réseau public de distribution. Ces traitements sont toujours appliqués en dehors des périodes d'utilisation de l'eau par les curistes pour éviter tout risque thermique ou chimique lié aux conditions d'application des protocoles de traitements et/ou aux produits de nettoyage et de désinfection utilisés.

3.2.3.1 Nettoyage.

Le nettoyage du réseau peut être effectué par des procédés mécaniques ou chimiques :

- les procédés mécaniques incluent le nettoyage à l'air ou à l'eau, le nettoyage à l'eau seule ou le nettoyage par le passage d'obus racleur dans les canalisations. Ces procédés présentent des contraintes mécaniques liées à leurs paramètres d'utilisation telles que la vitesse

de circulation de l'eau ou la taille des canalisations nécessaire à leur mise en place et ne sont donc pas adaptés à tous les types de réseaux de distribution (DGS, 2000).

- les procédés chimiques consistent à introduire un mélange d'acides, de réducteurs et d'un inhibiteur de corrosion dans les canalisations. Leur mise en place nécessite de connaître la composition des dépôts minéraux présents pour éviter toute interférence propre à limiter l'efficacité des produits utilisés ou à générer des sous-produits toxiques. Les produits utilisés ne doivent pas endommager les matériaux constitutifs du réseau, le nettoyage chimique de canalisations en acier galvanisé ou en cuivre est déconseillé. Le temps de contact des produits chimiques ne doit pas excéder 20 min et le nettoyage doit être suivi d'un rinçage efficace, à l'eau thermique ou potable, de façon à limiter les risques de corrosions ultérieurs (DGS, 2000).

3.2.3.2 Désinfection.

Les étapes de nettoyage sont suivies d'une désinfection pouvant être effectuée thermiquement ou chimiquement :

- les traitements thermiques consistent à faire circuler dans le réseau de distribution de l'eau à une température de 80 °C ou de la vapeur basse pression à environ 115 °C pendant 30 min. Ce type de traitements n'est compatible qu'avec un nombre restreint de matériaux (fonte ductile, cuivre et acier inoxydable) et doit être suivi d'un rinçage pour ramener la température de l'eau à celle de l'eau thermique.

- les traitements chimiques utilisés peuvent être oxydants ou non-oxydants. Deux types de produits oxydants sont autorisés : les oxydants dits forts, représentés par le chlore, et les oxydants dits faibles, représentés par le peroxyde d'hydrogène mélangé ou non à de l'acide peracétique. Une désinfection au chlore est suivie d'un rinçage à l'eau thermique ou potable. Le chlore utilisé à des concentrations supérieures à 2 mg/L est susceptible de dégrader l'acier inoxydable. Les oxydants faibles doivent être utilisés à des concentrations en peroxyde d'hydrogène de 1 000 mg/L, que celui-ci soit mélangé ou non à de l'acide peracétique, avec des temps de contact de 24 h. Ils sont compatibles avec les principaux matériaux constitutifs des réseaux de distribution d'eau thermique. Le traitement chimique à l'aide de produits non-oxydants consiste en l'introduction d'une solution sodique à pH 12 dans le réseau de distribution avec un temps de contact de 30 min. Son utilisation est susceptible de dégrader les éléments du réseau en fonte ancienne et en acier galvanisé (DGS, 2000).

L'emploi de ces produits oxydants comme non-oxydants est suivi d'un rinçage à l'eau thermique ou potable pour éliminer toute trace éventuelle de résidus chimiques (DGS, 2000).

3.2.3.3 Actions préventives et curatives.

Ces protocoles de nettoyage et de désinfection sont susceptibles d'être appliqués en prévention pour limiter le risque de contamination (actions préventives) ou en réponse à la détection d'une contamination (actions curatives) :

- les actions préventives sont régulièrement appliquées, à une fréquence variant de toutes les 48 h à une fois par semaine, et consistent en un traitement permettant d'éviter l'installation du biofilm. Ce traitement comprend généralement soit un nettoyage à l'eau suivi d'une désinfection chimique soit uniquement une désinfection thermique (DGS, 2000).

- les actions curatives font immédiatement suite à la détection d'une contamination. Elles comprennent un nettoyage suivi d'une désinfection. L'utilisation du chlore en curatif est effectuée à des concentrations comprises entre 10 et 150 mg/L. Selon les prescriptions de la DGS ces actions curatives peuvent être appliquées autant de fois que nécessaire (DGS, 2000). Néanmoins, des chocs thermiques ou chimiques répétés sont susceptibles d'altérer la surface des matériaux constitutifs du réseau de distribution. Cette altération peut diminuer l'efficacité des protocoles de traitements ultérieurs et/ou augmenter les risques de contaminations chimiques ou microbiologiques par corrosion des surfaces.

L'application des protocoles de nettoyage et de désinfection des réseaux de distribution d'eau thermique est associée à des procédures d'analyses des dangers et de maîtrise des points critiques. Le contrôle permanent de l'eau minérale naturelle, de ses produits dérivés (cosmétiques et boues) et des installations thermales peut être reconnu par certification. Par exemple, en France, la certification Aquacert, basée sur une démarche volontaire validée par le ministère de la santé et les professionnels du thermalisme, garantie aux curistes la qualité et la sécurité sanitaire des eaux thermales, des soins thermaux et des produits dérivés des eaux thermales. En Andorre, la certification Aquathermalcert® valorise la gestion de la qualité des eaux thermales des espaces thermoludiques.

Malgré l'application fréquente de protocoles de nettoyage et de désinfection du réseau de distribution et la mise en place de système de management de la sécurité sanitaire, le maintien de la qualité microbiologique de l'eau thermique au niveau exigé par la réglementation reste difficile.

4. Contamination microbiologique des réseaux de distribution d'eau thermique.

Suite à la parution de la circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336, imposant des exigences draconiennes de qualité microbiologique de l'eau thermique, un rapport de la DGS datant de 2005 avait pour objectif « de décrire la fréquence et l'ampleur des contaminations bactériennes

afin d'améliorer la gestion du risque microbiologique dans les établissements thermaux ». Cette enquête a établi que durant la saison thermale 2001² :

- 11 % des établissements thermaux ont été contaminés au moins une fois par des germes anaérobies sporulés sulfito-réducteurs.
- 19 % des établissements thermaux ont été contaminés au moins une fois par *E. coli*.
- 40 % des établissements thermaux ont été contaminés au moins une fois par *L. pneumophila*.
- 67 % des établissements thermaux ont été contaminés au moins une fois par *P. aeruginosa*.

Les contaminations à *P. aeruginosa* concernaient 8 % des émergences et 43 % des systèmes de stockage d'eau minérale naturelle, 43 % des points d'usage dédiés aux soins de type I, 28 % des points d'usage dédiés aux soins de types II et 59 % des points d'usages dédiés aux soins de type III et IV. Près de 18 % de la totalité des établissements thermaux présentaient des non-conformités à *P. aeruginosa* sur plus de 20 % de leurs analyses. Sur la totalité de ces analyses non conformes plus de 50 % présentaient une contamination comprise entre 1 et 100 unités formant colonies (ufc)/250 mL, 37 % entre 10 et 100 ufc/250 mL, 10 % entre 100 et 1 000 ufc/250 mL et 2 % étaient supérieures à 1 000 ufc/250 mL (DGS, 2005).

Une étude relative à la surveillance de *P. aeruginosa* aux thermes nationaux d'Aix-les-Bains identifie des facteurs de risques susceptibles de contribuer à ces problèmes de contamination (Morin et Graber-Duvernay, 2002). Elle rapporte que les contaminations n'ont jamais été détectées à la source mais ont été plus particulièrement mises en évidence aux points d'usage. Ces contaminations ont été reliées aux conditions d'exploitation et de conception des réseaux de distribution d'eau thermale. La détection de *P. aeruginosa* est survenue suite au refroidissement d'une eau minérale naturelle provenant d'une source chaude, par mélange avec eau minérale naturelle provenant d'une source de composition identique mais froide, à une température de 38 °C propice à l'implantation de la bactérie. Les robinets équipés de mitigeurs et les appareils de conception complexe utilisés pour les soins thermaux ont également été identifiés comme étant particulièrement vulnérables aux contaminations à *P. aeruginosa* par rapport à des robinets ou des appareils de conception plus simple. Leur vulnérabilité dépendrait aussi de leur fréquence de manipulation par le personnel soignant et les curistes.

² La totalité des établissements thermaux français a participé à l'enquête.

Dans cette étude, deux sources de contaminations possibles des réseaux de distribution d'eaux minérales naturelles sont évoquées :

- la présence de la bactérie à l'état viable non cultivable (VBNC pour Viable But Non Culturable) dans l'eau circulante (Morin et Graber-Duvernay, 2002). A l'état VBNC, la bactérie est viable, présente une très faible activité métabolique et ne croît pas sur les milieux de culture habituellement utilisés pour son isolation et son dénombrement (Oliver, 2010). Sa détection nécessite le recours à des techniques indépendantes de la culture relevant notamment de la biologie moléculaire. Le passage à l'état VBNC peut être induit par de faibles concentrations en nutriments, l'exposition à des températures défavorables à la croissance, à des concentrations osmotiques ou des conditions d'oxygénation extrêmes ou à des métaux. L'exposition à des concentrations en ions cuivre ou en chlore libre, typiques de celles retrouvées dans les réseaux de distribution d'eau potable, induit le passage de *P. aeruginosa* à l'état VBNC (Dwidjosiswojo *et al.*, 2011, Bédard *et al.*, 2014). Ces conditions sont susceptibles d'être retrouvées dans les réseaux de distribution d'eau thermique notamment, en ce qui concerne l'exposition au chlore, lors des traitements préventifs des réseaux de distribution. La présence d'ions cuivre dans l'eau thermique peut résulter de la corrosion du cuivre ou du laiton respectivement présents au niveau du réseau de distribution principal et au niveau des compteurs d'eau, des vannes, des robinets et des raccords (Bédard *et al.*, 2014). Bien que les bactéries puissent rester à l'état VBNC pendant une longue période de temps, cet état est réversible. La bactérie peut revenir à son état initial si elle est exposée à des conditions environnementales favorables à son développement ou à certains signaux environnementaux (Oliver, 2010). *P. aeruginosa* est de nouveau cultivable trois jours après la suppression du stress lié à la présence de cuivre par chélation et un jour après la suppression du stress lié au chlore, par dégradation naturelle de ce dernier (Bédard *et al.*, 2014).

- la contamination à rebours des points d'usage, ou rétro-contamination, par des curistes porteurs de la bactérie (Morin et Graber-Duvernay, 2002). La bactérie est transmise du patient vers le réseau de distribution lors de l'utilisation des points d'usage tels que les robinets, les douches ou les bains. Cette source de contamination est particulièrement rapportée dans les réseaux de distribution d'eau potable d'unités de soins intensifs (Lashéras *et al.*, 2006).

Les contaminations microbiologiques des réseaux de distribution d'eau minérale naturelle dans les établissements thermaux ont des conséquences économiques significatives liées aux frais techniques ou aux travaux de remises en état parfois nécessaires. Dans certains cas, ces contaminations peuvent également conduire à la fermeture administrative de l'établissement

entraînant des dépenses considérables dues aux pertes d'exploitation et/ou à l'indemnisation des curistes.

5. Données économiques.

D'après Lund (1996) les revenus annuels liés à l'utilisation des eaux minérales naturelles atteignent près de 10 milliards de dollars aux Etats-Unis et 6 milliards de dollars au Japon. En France, le volume d'activité généré par l'activité thermique a été estimé à 900 millions d'euros par le Conseil National des Exploitants Thermaux (CNETH), créé en 2002 et regroupant 90 % des exploitants français (CNETH, 2013).

La France, avec ses 89 stations thermales en activité et ses 103 établissements thermaux habilités par le ministère de la santé à dispenser une cure thermique (CNETH, 2013), est le troisième pays européen comprenant le plus de stations thermales après l'Allemagne et l'Italie (Jazé-Charvolin, 2014). Les établissements thermaux français reçoivent chaque année plus de 500 000 curistes pour des séjours d'en moyenne 18 jours (CNETH, 2013). L'activité thermique génère 100 000 emplois directs, indirects ou induits³, en partie dus aux accompagnants des curistes qui représentent près de 300 000 personnes par an (Jazé-Charvolin, 2014). La consommation des curistes et de leurs accompagnants ne concerne pas uniquement le secteur médical mais également les secteurs liés au transport, à l'hébergement et la restauration, aux services et aux loisirs (Tabone, 2009). Chaque nouvelle centaine de curistes conduirait à la création de 10 emplois (CNETH, 2013).

La sécurité des curistes au sein des établissements thermaux est assurée par une réglementation très stricte exigeant l'absence de microorganismes pathogènes au cours de l'exploitation de l'eau minérale naturelle. Cette interdiction est combinée à des possibilités de traitements de l'eau restreintes qui excluent le recours à un désinfectant en concentration résiduelle, tel que le chlore dans l'eau potable. La qualité microbiologique des eaux minérales naturelles est maintenue par le nettoyage et la désinfection quotidienne du réseau de distribution. Malgré la fréquence de ces traitements et un suivi permanent de la qualité de l'eau minérale naturelle, les établissements thermaux sont régulièrement confrontés à la contamination microbiologique de leur réseau de distribution (tableau 4). Ces contaminations sont susceptibles d'être sanctionnées par la fermeture administrative partielle ou totale de l'établissement.

³ Emplois directs : emplois directement générés par le thermalisme.

Emplois indirects : emplois générés dans la sous-traitance relative au thermalisme.

Emplois induits : emplois générés par la réinjection dans l'économie locale des revenus produits par les emplois directs et indirects.

Tableau 4 : Exemples de contaminations de réseaux de distribution d'eau thermale rapportées dans la presse grand public.

Thermes	Contamination				Presse grand public
	Date	Microorganismes	Localisation	Conséquences	
Barbazan	2001	<i>P. aeruginosa</i>	ni	fermeture de l'établissement	La dépêche du midi
Tercis	2001	<i>P. aeruginosa</i> <i>Legionella spp</i>	source	fermeture de l'établissement	La dépêche du midi
Divonne-les-Bains	2008	<i>P. aeruginosa</i>	cabines de soins	fermeture des cabines de soins contaminées	Tribune de Genève
Néris-les-Bains	2012 et 2013	<i>P. aeruginosa</i> <i>Legionella spp</i>	ni	fermeture de l'établissement	France 3 - Auvergne La Montagne

ni : non-indiqué

Les conséquences économiques de ces fermetures sont significatives pour l'établissement thermal et peuvent peser sur l'économie locale parfois fortement dépendante de l'activité thermale, 71 % des communes thermales françaises comprenant moins de 5 000 habitants (CNETH, 2013). A titre d'exemple, les dépenses associées à la contamination des thermes de Néris-les-Bains en 2013 et rapportées dans la presse grand public, ont été estimées à plusieurs milliers d'euros. Elles comprendraient notamment l'indemnisation des 800 curistes à hauteur de 230 000 euros, les frais techniques (analyses, conseil et audit) à hauteur de 260 000 euros et les travaux de simplification et d'amélioration du réseau à hauteur de 1,2 millions d'euros. L'indemnisation des curistes équivaldrait à elle seule au montant des bénéfices annuels réalisés par les thermes.

Les exploitants réinvestissent 10 à 25 % de leur chiffre d'affaire annuel dans le maintien et le renouvellement de la qualité de leurs installations (CNETH, 2013). Ce renouvellement permet notamment de satisfaire aux exigences de la réglementation française relative à l'exploitation des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques en établissements thermaux.

La surreprésentation de *P. aeruginosa* parmi les microorganismes à l'origine des contaminations des réseaux de distribution d'eau thermale, la récurrence et la persistance de ces contaminations, leurs conséquences économiques et l'absence de données dans la littérature scientifique internationale ont orienté ces travaux de thèse vers l'étude de l'implantation de *P. aeruginosa* dans le contexte spécifique aux eaux minérales naturelles.

II. *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Généralités et présentation de la bactérie.

Pseudomonas aeruginosa, ou bacille pyocyanique est décrite pour la première fois en 1872 sous l'appellation *Bacterium aeruginosum* par le chercheur allemand Schroeter. Les techniques microbiologiques de l'époque ne sont pas suffisantes pour permettre l'isolement de la bactérie⁴. Elle est alors observée sur des tranches de pommes de terre bouillies et dans du pus grâce au pigment bleu-vert soluble dans l'eau qu'elle produit (Hugh et Leifson, 1964). Cette couleur caractéristique provient de sa capacité à synthétiser certains pigments bactériens, principalement représentés par un sidérophore, la pyoverdine, et une phénazine, la pyocyanine, qui lui confèrent respectivement une couleur jaune-vert et bleu-vert (figure 3). Cette coloration est à l'origine de son nom, *aerugo* signifiant vert-de-gris en latin. L'isolement de *P. aeruginosa*, de plaies portées par des soldats, est rapporté pour la première fois en 1882 par le pharmacien militaire Charles Gessard, intrigué par la coloration azurée de plaies purulentes.

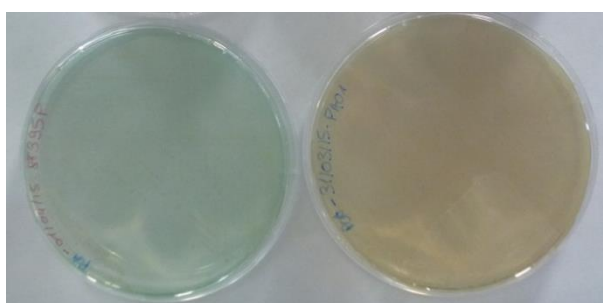


Figure 3 : Culture sur milieu PCA (plate count agar) pendant 24 h à 37 °C d'une souche de *P. aeruginosa* d'origine clinique (à gauche) et de la souche de référence PAO1 (à droite).

L'espèce *P. aeruginosa* fait partie de la classe des γ -protéobactéries au sein de laquelle elle appartient à l'ordre des *Pseudomonales*, à la famille des *Pseudomonaceae* et au genre *Pseudomonas*. Cette bactérie à gram négatif (gram⁻) est décrite comme mobile, possède une oxydase et une catalase, est capable de croître à des températures comprises entre 4 °C et 42 °C, est capable de métaboliser une grande diversité de nutriments et est considérée comme aérobie stricte (Palleroni, 2010). Néanmoins, en conditions anaérobies *P. aeruginosa* peut produire un accepteur d'électron alternatif au dioxygène, nécessaire au fonctionnement de sa chaîne respiratoire, par dénitrification en réduisant des nitrates ou des nitrites provenant de l'environnement. En l'absence de ces derniers, elle peut produire l'énergie nécessaire à son

⁴ La culture des bactéries sur milieux solides est développée à partir de 1875 dans les laboratoires de Ferdinand Cohn et Robert Koch, et l'isolement d'une bactérie sur un milieu gélifié est introduit en 1877 par Robert Koch et Erwin von Esmarch (Drews, 2000).

métabolisme par fermentation du pyruvate et de l'arginine, à raison d'une mole d'adénosine triphosphate (ATP) par arginine fermentée (Arai, 2011).

P. aeruginosa possède un des plus grands génomes bactériens actuellement connu comprenant 6,3 millions de paires de bases et 5 570 gènes putatifs. Il est à ce titre proche des génomes eucaryotes simples tel que celui de *Saccharomyces cerevisiae*. Lors du séquençage complet du génome de la souche de référence PAO1, une fonction a pu être assignée à plus de la moitié des gènes prédits. Ces derniers codent principalement pour le transport de petites molécules, la synthèse d'enzymes et la synthèse de régulateurs de transcription. Près de 8,4 % du génome de *P. aeruginosa* sont dédiés à la régulation. La taille et la complexité de son génome lui confère d'importantes capacités de résistance aux antibiotiques et aux biocides (Stover *et al.*, 2000). Elle peut avoir recours à des mécanismes de résistance innés (perméabilité membranaire faible, production de β -lactamase et capacité d'efflux importante) ou acquis par transfert horizontal de matériel génétique et/ou par mutation (Breidenstein *et al.*, 2011). Cette résistance naturelle est augmentée par sa forte aptitude à former du biofilm (Fernandez *et al.*, 2011). Sa plasticité génomique lui procure également d'importantes capacités d'adaptation et de virulence lui permettant de survivre dans des conditions environnementales variées.

2. Ecologie et occurrence dans les réseaux d'eau.

Naturellement présente dans l'environnement, *P. aeruginosa* a la capacité de coloniser une grande variété de niches écologiques et est à ce titre qualifiée d'ubiquitaire. Cette bactérie hydrotellurique peut être isolée d'environnements naturels tels que les sols (Lavenir *et al.*, 2007) ou les eaux de rivières (Mena et Gerda, 2009 ; Suzuki *et al.*, 2013), ou d'environnements anthropisés tels que des terres agricoles (Pitondo-Silva *et al.*, 2014), du compost de déchets industriels (Kaszab *et al.*, 2011) ou des eaux usées d'origine municipale ou clinique (Schwartz *et al.*, 2006 ; Lavenir *et al.*, 2007). Elle est majoritairement associée aux milieux hydriques (tableau 5) qu'ils s'agissent d'océans ouverts (Khan *et al.*, 2007), de baies océaniques (Kimata *et al.*, 2004), d'eaux douces (Mena et Gerda, 2009 ; Suzuki *et al.*, 2013), d'eaux récréatives (Martins *et al.*, 1995 ; Ibarluzea *et al.*, 1998, Brousseau *et al.*, 2009 ; Casanovas-Massana et Blanch, 2013), d'eau potable (Papapetropoulo *et al.*, 1994 ; Zamberlan da Silva *et al.*, 2008 ; Momtaz *et al.*, 2011 ; Stojek et Dutkiewicz, 2011) ou d'eaux minérales naturelles (Venieri *et al.*, 2006 ; Zamberlan da Silva *et al.*, 2008 ; Momtaz *et al.*, 2011 ; Thorolfssdottir et Marteinsson, 2013).

P. aeruginosa peut être retrouvée dans les réseaux intérieurs de distribution d'eau potable d'espaces privés (Papapetropoulo *et al.*, 1994 ; Szita *et al.*, 2006 ; Zamberlan da Silva *et al.*,

2008, Stojek et Dutkiewicz, 2011 ; Momtaz *et al.*, 2011) ou publics (Allen et Geldreich, 1975 ; Zamberlan da Silva *et al.*, 2008) où 2 % à 30 % des échantillons d'eau se révèlent être contaminés, à des concentrations généralement inférieures à 2 300 ufc/100 mL (Allen et Geldreich, 1975 ; Papapetropoulo *et al.*, 1994). Il n'a jamais été prouvé que l'eau potable contaminée puisse agir comme une source d'infection de la population générale par voie orale (ANSES, 2010), la dose nécessaire à l'infection d'un individu sain par ingestion ayant été estimée à 10^{10} ufc (Buck et Cooke, 1969 ; Mena et Gerda, 2009). Cependant, la présence de *P. aeruginosa* dans l'environnement hydrique est susceptible de présenter un risque dans les espaces publics accueillant des personnes à l'état de santé altéré tels que les établissements de santé ou les établissements thermaux.

La colonisation des réseaux de distribution d'eau potable par *P. aeruginosa* est particulièrement décrite dans l'environnement hospitalier (tableau 5). Dans les unités de soins intensifs, 5 à plus de 90 % des prélèvements d'eau potable effectués se révèlent être contaminés (Reuter *et al.*, 2002 ; van der Dee-Marquet *et al.*, 2005 ; Lashéras *et al.*, 2006 ; Rogues *et al.*, 2007 ; Cholley *et al.*, 2008 ; Durojaiye *et al.*, 2011 ; Quick *et al.*, 2014). Les points d'usage ont été identifiés comme plus vulnérables aux contaminations. Ces dernières peuvent être favorisées par de meilleures conditions d'oxygénation (Loveday *et al.*, 2014), des éléments de robinetterie de conception complexe ou des zones de rétention d'eau. Les robinets équipés de senseurs pour un déclenchement automatique ont été identifiés comme plus sensibles aux contaminations que les robinets manuels (Halabi *et al.*, 2001 ; Walker *et al.*, 2014). Leur siphon magnétique (Halabi *et al.*, 2001) et leur mousseur (Walker *et al.*, 2014), en plastique et de conception complexe, montrent des taux de contamination plus élevés que leurs autres composants. Les siphons des éviers sont également susceptibles de constituer une zone de rétention d'eau créant un environnement favorable au développement de la bactérie. Une étude hospitalière montre que 95 % des échantillons d'eau positifs à *P. aeruginosa* correspondent à des prélèvements effectués au niveau de siphons d'évier (Cholley *et al.*, 2008).

Tableau 5 : Exemples d'occurrence de *P. aeruginosa* dans divers environnements hydriques.

Type d'eau	Environnement	ufc/100 mL	Occurrence éch. positifs/total éch.	Ech. positifs	Pays	Référence
rivière	rivières Kyotake et Yae	2 à 46	ni	ni	Japon	Suzuki <i>et al.</i> , 2013
récréative	piscine publique - traitement par chloration	ni	27/1345	2 %	Brésil	Martins <i>et al.</i> , 1995
récréative	piscine publique - traitement par un mélange cuivre/argent	ni	30/322	9 %	Espagne	Ibarluzea <i>et al.</i> , 1998
récréative	piscine publique - traitement par chloration	ni	91/459	20 %	Espagne	Ibarluzea <i>et al.</i> , 1998
récréative	piscine publique	ni	188/250	75 %	Hongrie	Szita <i>et al.</i> , 2006
récréative	spa (jacuzzi, bains à remous)	1 à > 100	39/95	41 %	Québec	Brousseau <i>et al.</i> , 2009
récréative	piscine écologique privative	< 10	12/12	100 %	Espagne	Casanovas-Massana et Blanch, 2013
puits	ni	ni	92/160	56 %	Hongrie	Szita <i>et al.</i> , 2006
puits	réseau intérieur - résidence	ni	1/45	2 %	Pologne	Stojek et Dutkiewicz, 2011
puits	réseau intérieur - maison privative	ni	1/109	1 %	Pologne	Stojek et Dutkiewicz, 2011
potable	réseau intérieur	1 à 2 300	22/739	3 %	Etats-Unis	Allen et Geldreich, 1975
potable	réseau intérieur – eau du robinet	7	8/88	9 %	Grèce	Papapetropoulou <i>et al.</i> , 1994
potable	réseau intérieur – eau du robinet	ni	32/440	7 %	Hongrie	Szita <i>et al.</i> , 2006
potable	réseau intérieur – résidences et lieux de travail	ni	28/96	29 %	Brésil	Zamberlan da Silva <i>et al.</i> , 2008
potable	réseau intérieur – résidences urbaines	ni	21/111	19 %	Pologne	Stojek et Dutkiewicz, 2011
potable	réseau intérieur – résidences rurales (fermes)	ni	1/55	2 %	Pologne	Stojek et Dutkiewicz, 2011
potable	réseau intérieur – eau du robinet	ni	10/72	14 %	Iran	Momtaz <i>et al.</i> , 2011
potable	réseau intérieur - unité de soins intensifs (chambres)	ni	150/259	58 %	Allemagne	Reuter <i>et al.</i> , 2002
potable	unité de soins intensifs - réseau de distribution principal	ni	6/33	18 %	France	van der Mee-Marquet <i>et al.</i> , 2005
potable	réseau intérieur - unités de soins intensifs (robinets)	ni	22/31	71 %	France	van der Mee-Marquet <i>et al.</i> , 2005
potable	réseau intérieur - service de réanimation	ni	80/494	16 %	France	Lashéras <i>et al.</i> , 2006
potable	réseau intérieur - unité de soins intensifs (chambres)	ni	55/484	11 %	France	Rogues <i>et al.</i> , 2007
potable	réseau intérieur - unité de soins intensifs médicale	ni	10/189	5 %	France	Rogues <i>et al.</i> , 2007
potable	réseau intérieur - unité de soins intensifs (eau dans le siphon)	ni	193/224	86 %	France	Cholley <i>et al.</i> , 2008
potable	réseau intérieur - unités de soins intensifs (robinets)	ni	10/224	5 %	France	Cholley <i>et al.</i> , 2008
potable	réseau intérieur - unités de soins intensifs	> 300	10/10	100 %	Royaume –uni	Durojaiye <i>et al.</i> , 2011
potable	réseau intérieur - unité de soins intensifs et de soins aux grands brûlés	ni	39/78	50 %	Royaume –uni	Quick <i>et al.</i> , 2014
EMN	piscines naturelles – Hvervellir	3 000 à 40 000	5/5	100 %	Islande	Thorolfsdottir et Marteinnsson, 2013
EMN	piscines naturelles - Landmannalaugar	1 300 à 2 300	5/5	100 %	Islande	Thorolfsdottir et Marteinnsson, 2013
EMN	embouteillée	ni	90/1 527	6 %	Grèce	Venieri <i>et al.</i> , 2006
EMN	embouteillée – libre-service/fontaine	ni	45/77	58 %	Brésil	Zamberlan da Silva <i>et al.</i> , 2008
EMN	embouteillée	ni	11/22	50 %	Brésil	Zamberlan da Silva <i>et al.</i> , 2008
EMN	embouteillée	-	3/152	2 %	Iran	Momtaz <i>et al.</i> , 2011

EMN : Eau Minérale Naturelle, ni : non-indiqué, éch. : échantillon,

3. Impact sanitaire.

Chez les individus en bonne santé l'inhalation d'aérosols et l'exposition de peau lésée, des yeux et des oreilles à de l'eau contaminée (Mena et Gerda, 2009) sont susceptibles de provoquer des folliculites et des otites et plus rarement des infections des yeux et des tractus respiratoires et urinaires (Rice *et al.*, 2012). Le risque d'infections gastro-intestinales par ingestion d'eau est considéré comme faible (Mena et Gerda, 2009).

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections affectant plus particulièrement les personnes fragilisées, immunodéprimées et les grands brûlés (Lyczak *et al.*, 2000). Cette bactérie est plus particulièrement associée aux infections respiratoires survenant chez les patients atteints de mucoviscidose (Quick *et al.*, 2012). Les souches de *P. aeruginosa* isolées de ces patients présentent une modification de leur phénotype. Elles prennent une apparence visqueuse liée à la surproduction d'un exopolysaccharide, l'alginate, et sont alors qualifiées de mucoïdes. Cette surproduction est induite par les conditions d'oxygénation limitées retrouvées dans le tractus respiratoire. Ces souches sont également caractérisées par de faibles capacités de croissance, la limitation de leur capacité de mobilité et la perte de l'expression de certains de leurs facteurs de virulence (Rau *et al.*, 2010).

L'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé en France, menée pendant la période mai-juin 2012, rapporte que *P. aeruginosa* représente 8,4 % des microorganismes identifiés comme responsables d'infections nosocomiales. Elle est impliquée dans 6,9 % des infections urinaires, 6,9 % des infections du site opératoire, 18,1 % des pneumonies et 44,1 % des infections de la peau et des tissus mous. Sa présence diffère selon le type de service considéré, elle représente 14 % des microorganismes identifiés comme responsables d'infections nosocomiales en service de réanimation contre moins de 10 % dans les services de chirurgie et de médecine et moins de 4 % dans les services de psychiatrie ou d'obstétrique (Thiolet *et al.*, 2012).

Des facteurs augmentant les risques de contracter une infection à *P. aeruginosa* ont été identifiés, ils incluent les maladies pulmonaires obstructives chroniques, les plaies liées aux brûlures, le recours à une ventilation mécanique et de façon plus générale le recours à des dispositifs invasifs (Blanc *et al.*, 2007). Les risques de colonisation sont augmentés par la prescription médicamenteuse dont les antibiotiques (Koh *et al.*, 2005 ; Blanc *et al.*, 2007).

La colonisation d'un patient peut provenir du portage endogène de la bactérie préalablement à l'admission hospitalière ou de son acquisition au cours de l'hospitalisation.

La contribution des facteurs endogènes ou exogènes dans la transmission, la contamination ou la colonisation du patient varie notamment selon le service hospitalier et/ou l'établissement de santé considéré, le taux de contamination de l'environnement et le respect des protocoles de nettoyage et de désinfection (Blanc *et al.*, 2007).

P. aeruginosa peut être commensale du tube digestif : le dépistage systématique pratiqué lors de l'admission dans certains services hospitaliers, met en évidence la présence de la bactérie chez 2 à 10 % des sujets admis en bonne santé (Cholley *et al.*, 2008). La bactérie est susceptible d'être transmise d'un patient porteur directement à d'autres patients ou indirectement par manutention par le personnel soignant (Bertrand *et al.*, 2011). Une étude descriptive et prospective des réservoirs et modes de transmission de *P. aeruginosa* dans une unité de soins intensifs a montré que parmi les 61 soignants testés, trois présentaient des prélèvements des mains positifs à *P. aeruginosa* et une transmission de la bactérie d'une main contaminée d'un soignant à un patient a été suspectée (Lashéras *et al.*, 2006). Le transfert de la bactérie à l'environnement joue également un rôle dans la transmission de la bactérie. Les résultats d'une étude s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaire pour identifier la source d'un épisode de contaminations à *P. aeruginosa* montrent que 6 % des prélèvements d'environnements secs, 26 % des prélèvements d'environnements humides et 50 % des prélèvements d'eau potable effectués dans une unité de soins aux grands brûlés et une unité de soins intensifs sont positifs à *P. aeruginosa* (Quick *et al.*, 2014). Les réseaux de distribution d'eau potable sont ainsi suspectés de participer à la transmission de la bactérie. En unités de soins intensifs, certains épisodes de contamination à *P. aeruginosa* ont pu être mis en relation avec la contamination du réseau de distribution d'eau potable par l'isolement de souches communes aux patients et à l'environnement. L'utilisation de méthodes de typage a montré que 7 à 50 % des patients colonisés sont porteurs d'une souche identique à une de celles isolées du réseau de distribution d'eau potable (tableau 6).

Tableau 6 : Etudes mettant en évidence le rôle du réseau de distribution d'eau potable dans la transmission de *P. aeruginosa* aux patients en unités de soins intensifs.

Pays	Durée de l'étude	Unité de soins intensifs	nbre de souches communes aux patients et à l'eau potable /nbre de patients contaminés	Référence
Fr.	6 mois	Hôpital universitaire de Saint-Etienne	4/26 (15 %)	Berthelot <i>et al.</i> , 2001
Al.	7 mois	Hôpital universitaire d'Ulm	4/17 (24 %)	Trautmann <i>et al.</i> , 2001
Al.	ni	Hôpital universitaire d'Ulm	5/45 (11 %)	Reuter <i>et al.</i> , 2002
Sui.	1 an	Hôpital universitaire de Lausanne	15/132 (11 %)	Blanc <i>et al.</i> , 2004
Esp.	3 ans	Hôpital universitaire de Barcelone	19/31 (61 %)	Vallés <i>et al.</i> , 2004
Al.	6 mois	Hôpital universitaire d'Ulm	8/16 (50 %)	Trautmann <i>et al.</i> , 2006
Fr.	6 mois	Hôpital universitaire de Bordeaux	7/38 (18 %)	Rogues <i>et al.</i> , 2007
Fr.	2 mois	Hôpital universitaire de Besançon	1/14 (7 %)	Cholley <i>et al.</i> , 2008

Fr : France, Al. : Allemagne, Sui. : Suisse, Esp. : Espagne, ni : non-indiqué.

Une étude menée dans une unité de soins aux grands brûlés au Royaume-Uni rapporte que près d'un tiers des patients est colonisé par *P. aeruginosa* au cours de leur hospitalisation. L'eau et le matériel d'hydrothérapie utilisés lors des traitements ont été suspectés comme étant la source de transmission (Quick *et al.*, 2012). Le transfert de la bactérie au matériel médical est en effet susceptible de participer à la transmission de la bactérie au sein des services hospitaliers. Lors d'une épidémie de *P. aeruginosa* au sein d'une unité de soins intensifs, un bronchoscope flexible a été identifié comme une source de contamination. Cet appareil médical invasif aurait été contaminé suite à son utilisation et à un défaut d'application des protocoles de décontamination et d'isolement (Bou *et al.*, 2006). La capacité de *P. aeruginosa* à survivre, persister et se multiplier dans ces différents environnements est associée à sa faculté à s'implanter sous la forme biofilm (Floret *et al.*, 2009).

Le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* lui est conféré par sa faculté à synthétiser un véritable arsenal de facteurs de virulence. Ces derniers peuvent être ancrés à la surface de la cellule bactérienne, tels que le flagelle, les pili ou les lipopolysaccharides, ou être sécrétés dans le milieu extérieur, tels que les exotoxines, les sidérophores et les phénazines.

4. Principaux facteurs de virulence.

4.1 Flagelle.

Le flagelle est une organelle extracellulaire de la bactérie constituée de trois éléments principaux indispensables à son fonctionnement : le corps basal, le crochet et le filament (figure 4). Le corps basal assure l'ancrage du filament à la membrane cellulaire. Il abrite l'appareil de sécrétion, nécessaire à la production et l'assemblage des protéines formant le filament, et un élément appelé moteur. Ce moteur, de composition complexe, comprend une partie mobile, le rotor, et une partie non mobile, le stator. Ce dernier convertit le potentiel d'énergie généré par un gradient chimique en énergie mécanique transmise au rotor. Le mouvement de rotation en résultant est transmis du rotor au filament par le crochet, le filament agit alors comme un propulseur (Anderson *et al.*, 2010). Le filament correspond à un assemblage de protéines, les flagellines, dont il peut comprendre 20 000 copies, et peut atteindre plusieurs microns de long (Haiko et Westerlund-Wikström, 2013).

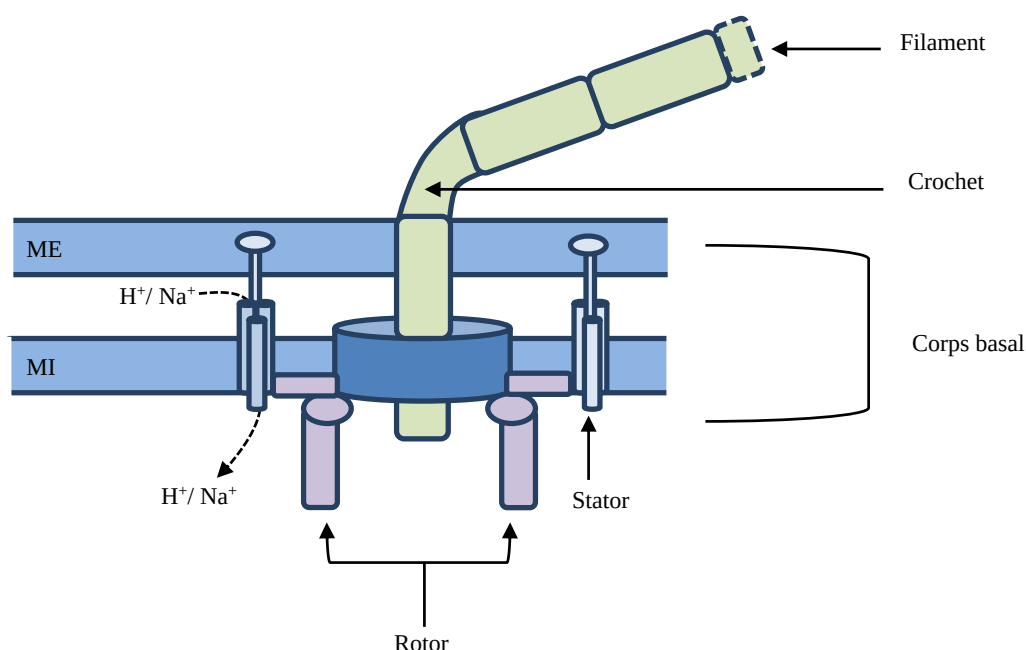


Figure 4 : Schéma des principaux éléments constitutifs d'un flagelle (MI : Membrane Interne ; ME : Membrane Externe).

L'énergie produite par les gradients chimiques est indispensable au mouvement du ou des flagelles. Elle est généralement générée par un gradient de sodium ou de protons : son fonctionnement peut consommer près de 5 % du sodium cytoplasmique d'une bactérie par seconde à raison de 1 000 ions par révolution (Mitchell et Kogure, 2006). Le fonctionnement du flagelle supporte notamment deux types de mobilité, la nage ou « swimming » et le

grouillement ou « swarming », nécessaires au déplacement de la bactérie dans un environnement aqueux ou semi-solide (Kearns, 2010). Le sens de rotation du flagelle impacte cette mobilité : une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre conduit à un mouvement uniforme sans changement de direction, à l'inverse une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre conduit à un mouvement plus anarchique conduisant à un changement de direction. L'inversion du sens de rotation du flagelle participe à l'attachement de la bactérie sur une surface. Ce sens est dépendant de la présence de gradient de molécules chimiques qui peuvent être attirantes/chimioattractantes ou répulsives. La présence de molécules chimioattractantes en faibles concentrations et/ou la présence de molécules répulsives conduit à un changement de direction lié à un sens de rotation inverse au sens des aiguilles d'une montre. Les nutriments tels que les sources de carbones (succinate, citrate, malate et sucres), d'acides aminés ou de phosphate, l'oxygène, les éthylènes et certains composés aromatiques (benzoate, toluène, phénol, catéchol, vanillate et vanilline) sont décrits comme jouant le rôle de chimioattractants tandis que les toxines ou les composés toxiques tels que les chloroéthylènes sont décrits comme ayant un effet répulsif (Kato *et al.*, 2008 ; Guttenplan et Kearns, 2013). Ces phénomènes d'attraction ou de répulsion exercés par certaines substances sur les cellules bactériennes sont appelés chimiotactisme.

Le flagelle est initialement lié à la mobilité de la bactérie mais peut également intervenir dans l'export de protéines et la virulence. Il adhère aux cellules épithéliales par fixation sur un composant membranaire commun, l'asialo-GM₁, et peut induire une réponse inflammatoire (Kipnis *et al.*, 2006). Les flagellines composant le filament sont porteuses d'un motif PAMP (Pattern Associated Molecular Pattern) reconnu par les récepteurs de type TLR5 (Toll-Like Receptor) notamment exprimés sur la surface baso-latérale des cellules épithéliales intestinales, sur les monocytes et les fibroblastes. Cette reconnaissance active la sécrétion de cytokines contribuant à l'induction d'une réponse inflammatoire (Haiko et Westerlund-Wikström, 2013). Le flagelle joue un rôle important dans la dissémination de la bactérie au sein de l'hôte (Lyczak *et al.*, 2000). Cependant, sa présence induisant une forte réponse immunogénique, *P. aeruginosa* a développé la capacité de sélectionner des mutants non flagellés après la colonisation de l'hôte dans le but d'échapper à ses défenses immunitaires (Kipnis *et al.*, 2006).

4.2 Pili.

4.2.1 Fimbriae ou pili de la voie chaperone-usher.

Les fimbriae ou pili de la voie « chaperone-usher » (CU) sont les appendices non flagellaires les plus fréquemment retrouvés à la surface des cellules. De 7 à 8 nm de large pour

2 μm de long, ces "filaments" sont constitués d'un assemblage de pilines pouvant aller d'une centaine à plusieurs milliers de sous-unités polymérisées (Allen *et al.*, 2012). L'assemblage de ces sous-unités protéiques est assuré par la voie dite « chaperone-usheer ». Les sous-unités protéiques produites dans le cytoplasme sont exportées vers le périplasme où elles sont prises en charge par une protéine dite chaperon. Cette dernière stabilise et inactive la sous-unité fimbriale, évitant toute dégradation ou polymérisation prématurée, et la transporte vers une protéine de la membrane externe dite placeur ou « usheer ». La partie centrale de celle-ci forme un pore dont le canal de translocation permet la sécrétion du pili vers le milieu extérieur. La sous-unité est transférée de la protéine chaperon à la sous-unité précédente retenue au niveau de la protéine « usheer ». Ce « collier de perle » est ainsi allongé unité par unité (Busch et Waksman, 2012).

L'existence de pili de la voie CU a été mise en évidence chez *P. aeruginosa* par Vallet *et al.* en 2001. Ces derniers ont montré l'existence de trois clusters de gènes, les systèmes CupA, CupB et CupC (Chaperone-usheer pathway) présentant des similarités de séquence avec les voies CU d'autres bactéries. Les pili du système CupA comprennent une sous-unités CupA4 agissant comme une adhésine et interviennent dans l'attachement de la bactérie aux surfaces abiotiques (Vallet *et al.*, 2001 ; Giraud et de Bentzmann, 2012). D'autres systèmes Cup ont pu être mis en évidence chez *P. aeruginosa* : les pili des systèmes CupA, B, C et E prennent la forme de longues fibrilles dont la plupart est porteuse d'une adhésine à son apex lui permettant de se fixer aux carbohydrates (Giraud *et al.*, 2010). Les systèmes CupB et CupC jouent un rôle dans les interactions entre cellules et sont impliqués dans les étapes de maturation du biofilm et le système CupE intervient dans la formation et la structuration du biofilm (Giraud *et al.*, 2011).

4.2.2 Pili de type IV.

Les pili de type IV sont les seuls pili communs aux bactéries à gram⁺ et à gram⁻. Ils prennent la forme de filaments flexibles mesurant plusieurs micromètres de long pour 5 à 8 nm de diamètres (Pelicic, 2008). On distingue deux familles de pili : les pili de type IVa et les pili de type IVb. Ces derniers comprennent une sous-famille, les pili Tad (Tight adherence) (Burrows, 2012). Ces familles se distinguent principalement par la longueur du peptide signal de leurs pilines : de moins de 10 acides aminés pour les pili de type IVa, retrouvés chez un grand nombre de bactéries, à près de 15 à 30 pour les pili de type IVb plus particuliers aux pathogènes entériques (Pelicic, 2008 ; Craig et Li, 2008). *P. aeruginosa* est une des rares espèces bactériennes à pouvoir posséder simultanément ces différentes formes de pili au sein d'une seule et même souche (Burrows, 2012).

Les précurseurs des pilines, les pré-pilines, sont synthétisées dans le cytoplasme de la cellule (figure 5) avant d'être recrutées dans la membrane interne via un système de sécrétion de type Sec (Craig et Li, 2008). Ce dernier permet la translocation de protéines immatures à travers un canal de la membrane interne grâce à l'énergie provenant d'une part de l'hydrolyse d'ATP et d'autre part d'un gradient de protons (Sardis et Economou, 2010). Les pré-pilines restent ancrées à la membrane interne à leur extrémité N-terminale avant que leur peptide signal soit clivé par une peptidase transmembranaire. Les pilines sont alors attirées vers le filament en cours d'élaboration, en partie grâce aux interactions électrostatiques induites entre les charges négatives portées par leur chaîne latérale et les charges positives portées par l'extrémité N-terminale de la dernière piline constitutive du filament. Chaque piline insérée allonge le filament qui est ainsi poussé vers le périplasma puis vers le milieu extérieur via une sécrétine insérée dans la membrane externe. Ce processus d'assemblage et le mouvement en résultant est énergie dépendant : c'est l'hydrolyse de l'ATP par des ATPases qui permet la polymérisation et la dépolymérisation du filament (Craig et Li, 2008). Le filament étant porteur d'adhésines à son extrémité distale, cette alternance de polymérisation/dépolymérisation génère un mouvement de la cellule par traction (Gerlach et Hensel, 2007).

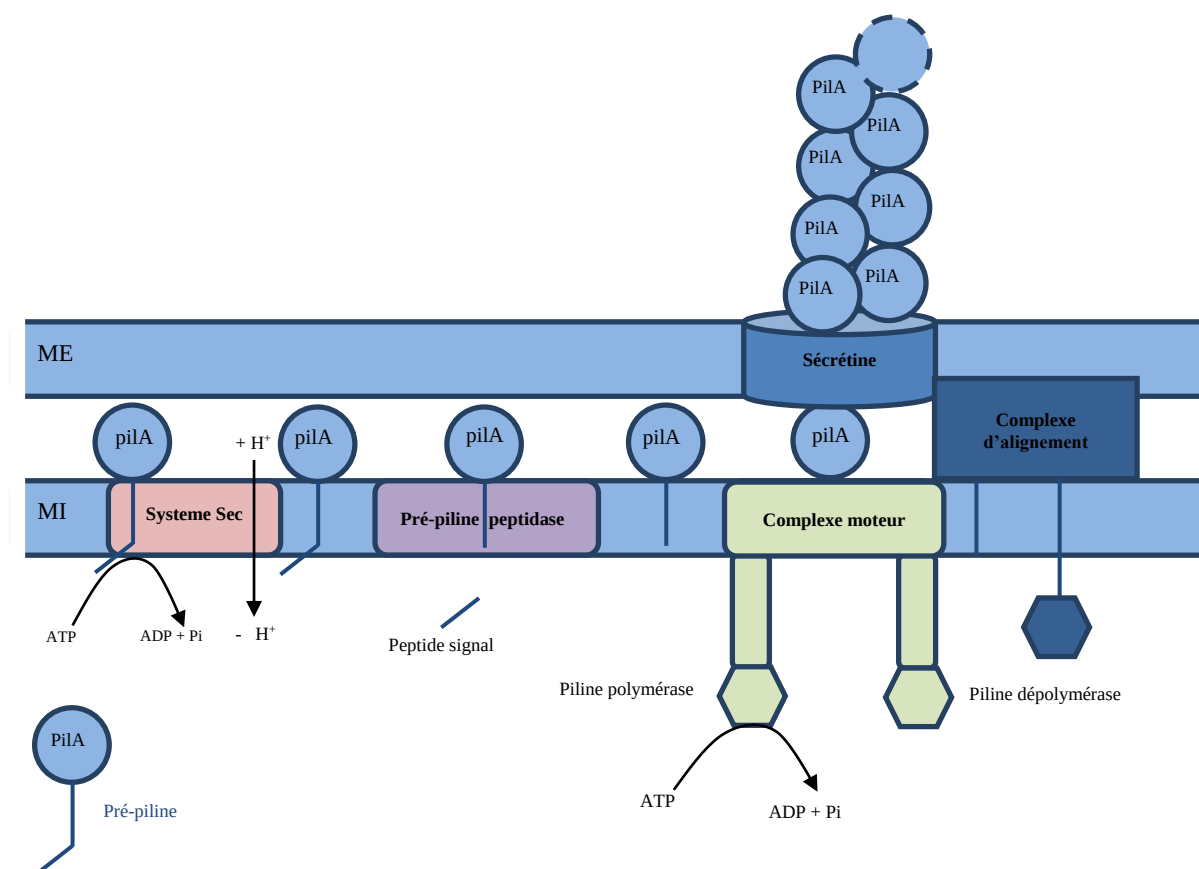


Figure 5 : Principaux éléments constitutifs de la machinerie de synthèse des pili de type IVa chez *P. aeruginosa* (MI : membrane interne, ME : membrane externe).

Les pili de type IVa sont impliqués dans la transduction de signal, la sécrétion, la capture d'ADN, l'auto-agrégation, l'adhésion et la formation de microcolonies (Craig et Li, 2008). Leur implication dans la mobilité participe à la dissémination de la bactérie au sein de l'hôte infecté (Lyczak *et al.*, 2000). Chez *P. aeruginosa*, les pili de type IVa sont porteurs d'un domaine de fixation situé à l'extrémité C-terminale des pilines constitutives du filament et permettant l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques par reconnaissance spécifique des domaines GalNac- β -D-(1,4)-Gal des asialo-GM₁ et asialo-GM₂, glycopeptides communément retrouvés à la surface des cellules épithéliales (Giltner *et al.*, 2006 ; Giraud *et al.*, 2010). Les pili de type IV interviennent également dans la structuration du biofilm lors de sa maturation (O'Toole et Kolter, 1998). Leur rôle dans l'adhésion et la structuration du biofilm est dépendant des conditions environnementales et n'est pas toujours indispensable à la formation d'un biofilm (Klausen *et al.*, 2003 ; Giraud *et al.*, 2010). Les pili de type IVb associés aux pili de type IVa sont plus particulièrement nécessaires à la formation des microcolonies au sein d'un biofilm précoce (De Bentzmann, 2006).

4.3 Lipopolysaccharides.

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des glycolipides complexes constituant la membrane externe des bactéries à gram⁻ d'où ils rayonnent de 31 à 36 nm vers le milieu extérieur. Ils sont chargés négativement à pH physiologique du fait de la présence de résidus d'acides uroniques et de groupements phosphates dans leur structure (Lindhout *et al.*, 2009). Les LPS sont à l'origine de réponses inflammatoires parfois fortes chez l'hôte infecté. Leurs trois composants, le lipide A, le corps oligosaccharidique et le polysaccharide O, n'ont pas la même implication dans la virulence.

Le lipide A correspond à la partie du LPS ancrée dans la membrane externe, il s'agit d'un disaccharide (diglucosamine biphosphate) auquel sont rattachées plusieurs chaînes d'acides gras (King *et al.*, 2009). Différentes formes de lipide A peuvent être observées selon l'espèce ou la souche considérée. Ces divergences concernent principalement le nombre, la position et la nature des groupements acyles rattachés à la structure initiale, la modification des groupes phosphates ou la longueur des chaînes d'acides gras (Lam *et al.*, 2011). Les chaînes d'acides gras rattachées au lipide A sont ainsi plus courtes chez *P. aeruginosa* que chez *E. coli*. La structure du lipide A se modifie en réponse à des signaux environnementaux. Ces modifications peuvent notamment être induites chez des souches environnementales par exposition à de faibles concentrations en magnésium, de l'ordre de 8 μ M (Ernst *et al.*, 1999), ou à des peptides antimicrobiens cationiques, éléments clés de la réponse immunitaire (Lam *et*

al., 2011). Ces modifications sont susceptibles de modifier la perméabilité de la cellule bactérienne augmentant sa résistance à certains antimicrobiens. La reconnaissance du lipide A par le complexe immunologique spécifique TLR4 (Toll-Like Receptor) induit une réponse inflammatoire (Lam *et al.*, 2011).

Le corps oligosaccharidique rattaché au lipide A est composé d'une dizaine d'oligosaccharides (King *et al.*, 2009) principalement de types D-galactosamine, L-rhamnose ou D-glucose (Lam *et al.*, 2011). Ce corps existe sous deux formes selon qu'il soit relié ou non au troisième élément constitutif des LPS le polysaccharide O. Le corps oligosaccharidique est spécifiquement reconnu par les récepteurs CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) des cellules épithéliales des poumons ou de la cornée. Cette reconnaissance permet l'internalisation des bactéries dans les cellules épithéliales. Dans le cas des poumons, cette internalisation est protectrice, les cellules épithéliales desquamant permettant l'élimination des bactéries piégées, tandis que dans le cas de la cornée cette internalisation conduit à une infection (Lam *et al.*, 2011).

On distingue deux formes de polysaccharides O, également appelés antigènes O, chez *P. aeruginosa* : l'antigène polysaccharide commun (CPA pour Common Polysaccharide Antigen) ou bande A et l'antigène polysaccharide spécifique (OSA pour O-Specific Antigen) ou bande B. Ces deux éléments diffèrent par leur structure : le CPA correspond à un homopolymère de D-rhamnose et le OSA à un heteropolymère de 3 à 5 sucres. Ces différences ont permis d'établir un système international de sérotypage basé sur la nature des unités saccharidiques répétées et distinguant 17 sérotypes (Lam *et al.*, 2011). Bien que les polysaccharides O aient tendance à induire une réponse immunogénique forte, l'OSA, présent chez une minorité des souches de *P. aeruginosa*, induit une réponse immunologique plus forte que celle du CPA retrouvé chez une majorité des souches de *P. aeruginosa* (King *et al.*, 2009). La présence ou l'absence de ces polysaccharides O influence la morphologie des colonies de *P. aeruginosa* qui prennent respectivement une apparence lisse ou irrégulière (Lau *et al.*, 2009). Son absence limite les capacités de mobilité de la bactérie liées au fonctionnement du flagelle. Cette altération de la mobilité est notamment due à l'augmentation des forces d'adhésion de la cellule à une surface biotique ou abiotique (Lindhout *et al.*, 2009). Les polysaccharides O sont plus particulièrement impliqués dans les interactions entre la cellule bactérienne et les cellules de l'hôte et contribuent à la protection de la bactérie contre la phagocytose et le stress oxydatif (King *et al.*, 2009).

4.4 Exotoxines.

Au moins cinq exotoxines sont synthétisées par *P. aeruginosa* (tableau 7).

L'exotoxine A (exoA) est sécrétée dans l'espace extracellulaire par le système de sécrétion de type II dépendant d'une machinerie de type Sec dont le fonctionnement nécessite l'hydrolyse d'un ATP (Kipnis *et al.*, 2006). Cette toxine est un enzyme appartenant à la famille des ADP-ribosyl transferase. Elle comprend trois domaines principaux dont le domaine N-terminal « Ia » responsable de la reconnaissance de la cellule bactérienne par les récepteurs CD91 des cellules hôtes et le domaine III porteur de l'activité catalytique de l'enzyme (Wolf et Elsässer-Beile, 2009). Cet enzyme catalyse la ribolysation de l'ADP du facteur d'élongation 2 des cellules eucaryotes conduisant à l'inhibition de la synthèse de protéines et à la mort cellulaire (Ramachandran, 2014).

Les exotoxines S, T, U et Y sont sécrétées par le système de sécrétion de type III. Cet assemblage moléculaire complexe traverse les membranes interne et externe de la cellule bactérienne, l'environnement externe et la membrane de la cellule cible. Il est généralement décrit comme une aiguille permettant l'injection de facteurs de virulence directement dans le cytoplasme de la cellule cible. Son fonctionnement nécessite le rapprochement entre la cellule bactérienne et la cellule cible, notamment assuré par les pili (Gerlach et Hensel, 2007).

L'exotoxine S (exoS) est un enzyme comprenant une fonction activatrice de GTPase et une activité ADP-ribosyltransferase (Galle *et al.*, 2012). Sa première fonction est à l'origine de perturbations du cytosquelette des cellules hôtes par activation des GTPases Rho, Rac et Cdc42 qui maintiennent sa structure. Ces perturbations permettraient de diminuer l'internalisation des cellules bactériennes par des cellules phagocytaires. L'induction de l'activité liée à la deuxième fonction portée par exoS nécessite la fixation d'un cofacteur d'origine eucaryote sur la région porteuse de l'activité ADP-ribosyltransferase de l'enzyme. Cette interaction provoque une perturbation du cytosquelette de la cellule eucaryote conduisant à sa déformation, à l'inhibition de la synthèse d'ADN et du trafic de différentes vésicules et de l'endocytose en résultant (Hauser, 2009).

La séquence d'acides aminés de l'exotoxine T (exoT) comprend 76 % d'identité avec celle de l'exoS. Cet enzyme comprend des fonctions catalytiques identiques mais dont le fonctionnement diffère de celles d'exoS. L'activité ADP-ribosyltransferase est ainsi limitée à un plus petit nombre de protéines cibles. Les deux activités catalytiques portées par exoT fonctionnent simultanément et conduisent à l'altération du cytosquelette inhibant la

prolifération, la migration et l'adhésion cellulaire. L'action de l'exoT sur la cellule cible intervient après 10 heures de contact contre 2 à 5 h pour l'exoS (Hauser, 2009).

L'exotoxine U (exoU) est une phospholipase dont le fonctionnement nécessite la fixation d'un cofacteur eucaryote, la super oxyde dismutase 1, et conduit à une mort cellulaire rapide en 1 à 2 h par désagrégation de la membrane plasmique (Hauser *et al.*, 2009). Son action contre les cellules épithéliales et les phagocytes participe à la dissémination de la bactérie au sein de l'hôte et à la persistance de l'infection. L'exoU serait 100 fois plus toxique que l'exoS (Kipnis *et al.*, 2006).

L'exotoxine Y (exoY) est une adénylate cyclase dont le fonctionnement nécessite la fixation d'un cofacteur eucaryote de nature jusqu'à maintenant inconnue (Kipnis *et al.*, 2006 ; Hauser *et al.*, 2009). Deux de ses domaines auraient la capacité de fixer de l'ATP. L'injection d'exoY dans des cellules mammifères provoque l'induction d'un signal intracellulaire conduisant à la modification de l'expression des gènes soumis à sa régulation. Cette action provoque la désagrégation du cytosquelette et conduit à l'inhibition de la capture des cellules bactériennes par les cellules hôtes et à l'augmentation de la perméabilité endothéliale (Hauser *et al.*, 2009).

Tableau 7 : Caractéristiques des principales exotoxines sécrétées par *P. aeruginosa* et de leur activité enzymatique.

Exotoxine	Système de sécrétion	Activité enzymatique	Cofacteur eucaryotique	Temps de contact avant mort cellulaire
exoA	type II	ADP-ribosyl transferase	-	-
exoS	type III	ADP-ribosyl transferase activité activatrice de GTPase	protéine 14-3-3	10 h
exoT	type III	ADP-ribosyl transferase activité activatrice de GTPase	protéine 14-3-3	2 à 5 h
exoU	type III	phospholipase	super oxyde dismutase 1	1 à 2 h
exoY	type III	adénylate cyclase	non identifié	-

4.5 Sidérophores.

Les sidérophores sont des agents de faible poids moléculaire chélatant le fer, micronutriment essentiel au métabolisme bactérien, sous sa forme non soluble Fe^{3+} . *P. aeruginosa* produit principalement deux sidérophores : la pyoverdine (PVD) et la pyochéline (PCH). Bien que possédant les mêmes fonctions de capture et de transport du fer, ces deux molécules diffèrent par leur taille, leur coût énergétique, leur affinité pour le fer et leur condition

de synthèse. La PVD présente une masse moléculaire de 1 350 g/mol, quatre fois plus élevée que celle de la PCH de 324 g/mol. La synthèse de la PVD implique 2,6 fois plus de gènes et 3,6 fois plus de nucléotides et d'acides aminés à transcrire et traduire que la PCH (Dumas *et al.*, 2013). La PVD présente une plus forte affinité pour le fer sous forme Fe^{3+} ($K_a = 10^{30,8} \text{ M}^{-1}$) que la PCH ($K_a = 10^{28,8} \text{ M}^{-1}$) et est préférentiellement produite par la bactérie dans des milieux pauvres en fer (Gasser *et al.*, 2015). A l'inverse, dans des milieux dont les concentrations en fer sont plus riches, mais restent tout de même limitées, *P. aeruginosa* produit préférentiellement la PCH à l'affinité pour le fer plus faible mais au coût énergétique moindre. La faculté à produire ces deux sidérophores offre à la bactérie de plus grande capacité de survie en lui permettant d'adapter ses dépenses énergétiques en fonction des modifications de son milieu de développement (Dumas *et al.*, 2013).

4.5.1 Les pyoverdines.

Les pyoverdines (PVDs) sont des pigments bactériens agissant comme facteur de virulence. Ces molécules sont composées de trois parties : un chromophore (dihydroxiquinolone), constituant le corps de la molécule et lui conférant sa pigmentation jaune verte et ses propriétés fluorescentes, complété par une chaîne acyle et une chaîne peptidique, rattachées respectivement aux carbones C3 et C1 du chromophore (Schalk et Guillon, 2012). La séquence de la chaîne peptidique, de taille réduite (6 à 12 acides aminés), est spécifique à chaque souche. Cette particularité permet le typage de souches par identification du groupe de PVD qu'elles produisent (Meyer *et al.*, 1997). Les souches de *P. aeruginosa* peuvent synthétiser trois types de PVDs, les groupes I, II et III, la souche de référence PAO1 produisant la PVD I (Visca *et al.*, 2006). Chaque type de PVD ayant à la surface des cellules bactériennes un récepteur qui lui est spécifique, leur diversité est un moyen efficace pour les bactéries de limiter le détournement de leur approvisionnement en fer par d'autres individus (Schalk et Guillon, 2012). Cependant certains récepteurs de PVDs moins restrictifs peuvent capter les PVDs d'une autre espèce, à l'exemple du récepteur de la PVD II de *P. aeruginosa* capable de reconnaître les pyoverdines PL7 et PL8 appartenant à *Pseudomonas fluorescens* (Cornelis et Matthijs, 2002). Ce système de détournement permet à la bactérie de préserver ses ressources énergétiques en profitant de celles des autres espèces à proximité.

La synthèse des PVDs est assurée par de nombreuses protéines principalement représentées par des peptides synthases non-ribosomales. Elles sont responsables de la synthèse d'un précurseur non fluorescent de la PVD, la ferribactine, dans le cytoplasme et de sa translocation et de sa cyclisation dans le périplasme. C'est cette cyclisation qui confère à la molécule sa fluorescence sous lumière ultra-violette (UV). Les PVDs produites sont stockées

dans le périplasme avant d'être sécrétées dans le milieu extérieur via la pompe à efflux PvdRT-OmpQ dont le fonctionnement est ATP dépendant (Schalk et Guillon, 2012). Ce système d'efflux est distribué uniformément dans la membrane cellulaire permettant la sécrétion du sidérophore tout autour de la cellule bactérienne. La mutation de ce système ne prévient que partiellement la libération de PVD dans l'environnement externe suggérant l'existence d'un système d'efflux supplémentaire (Gasser *et al.*, 2015).

La PVD libérée dans le milieu extérieur complexe le fer sous forme Fe^{3+} avec une stoechiométrie PVD/ Fe^{3+} de 1:1. La forte affinité des PVDs pour le fer sous forme ferrique Fe^{3+} lui est procurée par ses groupes fonctionnels catécholate et hydroxamate (Gasser *et al.*, 2015). Le complexe est importé du milieu extérieur vers le périplasme de la cellule via deux transporteurs spécifiques portés par la membrane externe, FpvA et FpvB, respectivement transporteur primaire et secondaire (figure 6 B). Ces transporteurs sont activés à l'aide de l'énergie produite à partir d'un gradient de protons par l'intermédiaire de la machinerie intramembranaire TonB (Schalk et Guillon, 2012). La liaison du ferrisidérophore à son récepteur régule l'expression du gène codant pour le facteur anti-sigma FpvR, impliqué dans l'inhibition de deux facteurs sigma responsables de la régulation des gènes codant pour le récepteur de sidérophores FpvA et la synthèse de PVD : le système s'autorégule (Llamas *et al.*, 2014). Suite à l'entrée du ferrisidérophore dans le périplasme, le complexe est dissocié par réduction du fer alors libéré sous sa forme Fe^{2+} sans altération du sidérophore. Le fer se lie au régulateur de transcription Fur, le complexe ainsi formé se fixe sur la région comportant les gènes d'intérêt empêchant leur transcription. Cette interaction conduit notamment à l'inhibition de la synthèse de PVD. Cette dernière est donc dépendante des concentrations en fer extra et intracellulaires. Les PVDs libres sont recyclées par la bactérie : elles sont une nouvelle fois sécrétées dans l'environnement via la pompe à efflux PvdRT-OmpQ (Schalk et Guillon, 2012).

La pyoverdine joue un rôle dans la virulence : sa reconnaissance par le transporteur FpvA induit un signal conduisant à la régulation de l'expression de gènes codant pour des facteurs de virulence tels que l'exotoxine A et les endoprotéases PrpL (protéase IV) et AprA (protease alcaline) (Visca *et al.*, 2006) impliquées dans la dissémination de la bactérie au sein de l'hôte (Lyczak *et al.*, 2000).

4.5.2 Les pyochélines.

La pyochéline (PCH) diffère de la plupart des sidérophores par son faible poids moléculaire, sa faible solubilité dans l'eau, résultant de sa forte hydrophobicité, et sa capacité à chélater du fer sous la forme Fe^{3+} en absence de groupements catécholates et/ou hydroxamates (Cobessi *et al.*, 2005).

Les pyochélines (PCH) sont produites à partir du chorismate (acide-3-oxy-4-hydroxycyclohexa-1,5-diène-1-carboxylique) : elles correspondent au produit de la condensation de salicylate et de deux L-cystéines. Leur biosynthèse a intégralement lieu dans le cytoplasme et ne nécessite pas d'étape de maturation dans le périplasma contrairement à la PVD. Cette absence de maturation suggère qu'une fois synthétisées les PCH sont directement sécrétées du cytoplasme vers le milieu extérieur via un mécanisme d'efflux non identifié (Gasser *et al.*, 2015). La PCH libérée dans l'environnement chélate le Fe^{3+} avec une stoechiométrie PCH/ Fe^{3+} de 2:1 : une molécule de fer est piégée au sein d'une structure hexacoordonnée octaédrique formée par l'association d'une PCH bidentée à une PCH tridentée (Gasser *et al.*, 2015). Le complexe est importé du milieu extérieur vers le périplasma de la cellule via le transporteur FptA inséré dans la membrane externe (figure 6 A). Ce transporteur reconnaît et fixe spécifiquement une seule PCH suggérant que les deux molécules nécessaires à la capture du fer ne sont pas toutes les deux indispensables à l'intégration du complexe dans la cellule. Son fonctionnement nécessite de l'énergie produite à l'aide d'un gradient de protons par l'intermédiaire de la machinerie intramembranaire TonB (Schalk et Guillon, 2012). Ce complexe est ensuite transporté du périplasma vers le cytoplasme via la perméase FptX insérée dans la membrane interne (Cunrath *et al.*, 2015). La libération du fer proviendrait de sa réduction de la même façon que pour la PVD. Les PCHs seraient également recyclées par la bactérie (Schalk *et al.*, 2011).

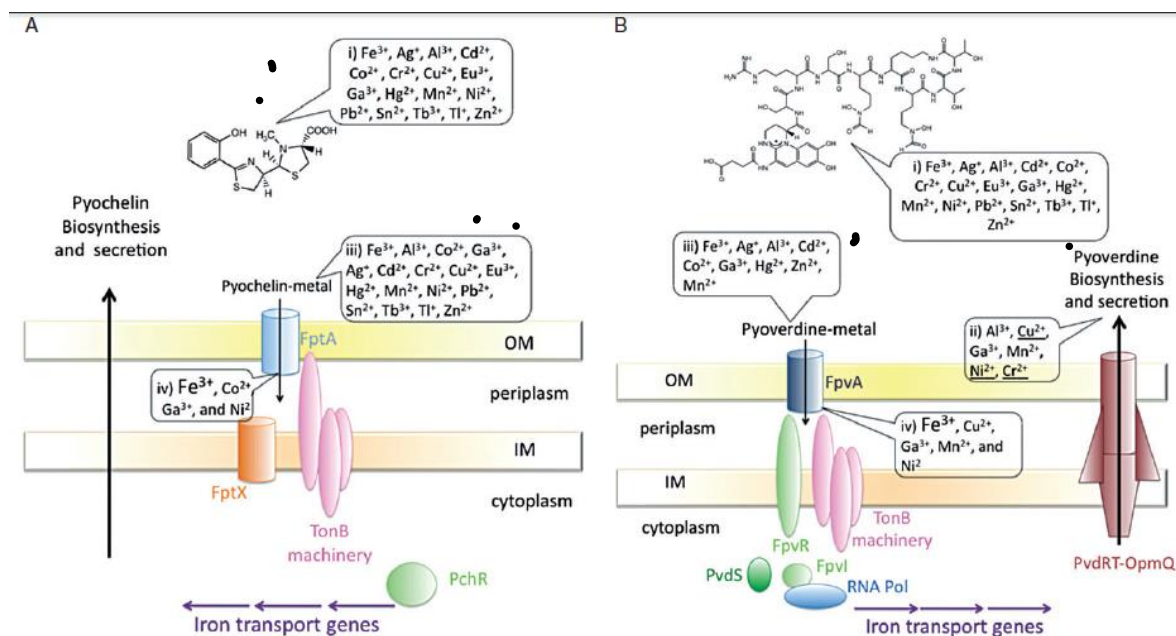


Figure 6 : Schéma de la capture et du transport du fer par (A) la pyochéline et (B) la pyoverdine (Schalk *et al.*, 2011).

4.6 Cas particulier des phénazines.

Les phénazines sont des métabolites secondaires, uniquement retrouvés chez les bactéries dont les *Pseudomonas* fluorescents et les **archeabactéries**. Il s'agit de composés hétérocycliques contenant des groupes azotés, leurs propriétés physicochimiques variant selon la nature et le positionnement de ces groupes au sein de la molécule (Pierson III et Pierson, 2010). Leur structure aromatique leur confère la possibilité d'endosser le rôle de donneur ou d'accepteur d'électrons. En présence d'agents réducteurs, les phénazines entrent dans un cycle de réduction de l'oxygène libérant des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species), tels que le peroxyde d'hydrogène ou le superoxide $\cdot\text{O}_2^-$. La génération de ROS étant délétère pour les cellules exposées (Britigan *et al.*, 1992), les microorganismes producteurs de phénazines se protègent du stress oxydatif généré en synthétisant des superoxydes dismutases et des catalases, enzymes ayant la capacité de dégrader ces ROS. Une même bactérie peut avoir la possibilité de produire simultanément plusieurs types d'éléments dérivés des phénazines à partir de deux précurseurs : l'acide phenazine-1,6-dicarboxylique ou l'acide phenazine-1-carboxylique (PCA). La souche de référence PAO1 synthétise ainsi trois dérivés de la phénazine à partir de la PCA, la phenazine-1-carboxamide, la 1-hydroxyphenazine et la pyocyanine (PCN), tandis que la souche PA14 produit préférentiellement la PCN (Mavrodi *et al.*, 2001).

Les capacités oxydo-réductrices des phénazines leur permettent d'agir comme facteurs de virulence et/ou comme antibiotiques (Blankenfeldt et Parsons, 2014). La production de phénazines chez les patients atteints de mucoviscidose aggrave l'infection respiratoire due à *P. aeruginosa* et diminue la capacité d'autres pathogènes opportunistes, tels que *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* et *Candida albicans*, à s'implanter de façon durable (Morales *et al.*, 2013). La PCN est également un pigment bactérien donnant une couleur bleu-vert aux cultures de *P. aeruginosa* et changeant de couleur selon son état d'oxydation et les conditions de pH (Mentel *et al.*, 2009). Elle contribue fortement à la virulence de la bactérie au sein de l'hôte en interférant notamment avec la régulation du transport du fer, la fréquence de battements des cellules cilliaires et la sécrétion du mucus des cellules épithéliales du tractus respiratoire en altérant les concentrations cytosoliques en calcium (Denning *et al.*, 1998).

L'ensemble des facteurs de virulence produit par *P. aeruginosa* joue un rôle important dans l'infection de l'hôte humain. Certains de ces facteurs sont également impliqués dans la formation de biofilm. Cette forme d'implantation de la bactérie dans l'environnement participe à sa virulence chez l'homme et favorise sa résistance et sa persistance dans l'environnement extérieur.

III. Biofilm de *P. aeruginosa* et implantation dans les réseaux de distribution d'eau.

1. Généralités.

Le biofilm est communément défini comme des populations de microorganismes adhérentes à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire d'une matrice extracellulaire autoproduite (Costerton *et al.*, 1995). Cette matrice extracellulaire prend la forme d'un réseau de structure tridimensionnelle complexe, composé d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et de biosurfactant et est susceptible de piéger des éléments provenant de l'environnement telles que des particules inorganiques (Costerton *et al.*, 1995). L'évolution de cette structure au cours de la formation du biofilm conduit à la création de gradients d'éléments indispensables au métabolisme bactérien, tels que l'oxygène ou les nutriments, ou des déchets qui en sont issus, telles que les toxines. La génération de ces gradients conduit à la formation de niches écologiques appropriées à l'installation et/ou au développement d'espèces ou de sous-populations adaptées à ces microenvironnements spécifiques (Wingender *et al.*, 2011). Le biofilm est ainsi caractérisé par une hétérogénéité métabolique, l'expression de gènes spécifiques relevant d'une réponse générale au stress et une augmentation de la présence de variants phénotypiques, d'échange de matériel génétique et du taux de mutation (Bridier *et al.*, 2011). L'ensemble de ces facteurs participe à l'augmentation de la résistance des microorganismes présents au sein des biofilms. La matrice extracellulaire contribue également à cet effet : les éléments la composant sont susceptibles de neutraliser les substances actives des biocides utilisés (Bridier *et al.*, 2011).

Le développement de biofilm dans les réseaux de distribution d'eau potable ou d'eau minérale naturelle favorise l'implantation, la persistance voire la multiplication, la résistance, la dissémination et la transmission de microorganismes pathogènes telle que *P. aeruginosa*. Certains facteurs de virulence de *P. aeruginosa* jouent un rôle significatif dans la formation et le développement de biofilm (tableau 8). Le flagelle et les pili, organelles indispensables à la mobilité de la bactérie, participent à la reconnaissance de la surface en assurant notamment le contact et l'adhésion à cette surface. Les pili interviennent également au cours du développement de la matrice extracellulaire. L'implication de ces facteurs de virulence dépend de l'étape de développement du biofilm, celui-ci répondant à un cycle de vie comprenant plusieurs phases clés.

Tableau 8 : Récapitulatifs des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, impliqués dans la formation de biofilm et de leurs caractéristiques et leurs fonctions.

Facteur de virulence	Caractéristiques	Fonctions	Rôles dans l'infection chez l'hôte humain	Rôles dans la formation de biofilm
Flagelle	Taille : plusieurs microns ATP dépendant Energie dépendant -Na ⁺ ou H ⁺	Mobilité de type swimming Mobilité de type swarming Chimiotactisme Virulence	Induction d'une réponse inflammatoire Dissémination	Rencontre avec la surface
Pili de la voie CU	Taille : 2 µm Ø : 7 à 8 nm	Virulence Adhésion	Adhésion aux cellules de l'hôte	Interaction cellule/cellule Initiation Structuration Maturation
Pili de type IV	Taille : plusieurs microns Ø : 5 à 8 nm Sous-unités : IVa, IVb et Tad ATP dépendant Energie dépendant - H ⁺	Mobilité Virulence Adhésion	Dissémination Adhésion aux cellules de l'hôte	Formation des microcolonies Initiation Structuration Maturation
Sidérophores		Transport et capture du fer		
Pyoverdines (PVD)	Forte affinité pour le fer, haut poids moléculaire et fort coût énergétique	Pigment bactérien et Virulence	Apport du fer nécessaire au métabolisme bactérien et à la synthèse et la régulation de certains des facteurs de virulence	apport du fer nécessaire au métabolisme bactérien et à la synthèse d'éléments constitutifs du biofilm
Pyochélines (PCH)	Faible affinité pour le fer et faible poids moléculaire et coût énergétique	-		
Phénazines dont la pyocyanine (PCN)	Donneur/accepteur d'électrons	Virulence Pigment bactérien	Augmentation du stress oxydatif Altération des concentrations cytosoliques en calcium	-

2. Cycle de développement du biofilm.

Le cycle de développement du biofilm comprend cinq étapes clés (figure 7) : l'attachement réversible, l'attachement irréversible, la maturation I, la maturation II et la dispersion. Chaque cycle aboutit à la libération d'individus mobiles capables de coloniser de nouvelles surfaces et de donner naissance à de nouveaux biofilms (Yadav *et al.*, 2008). Une étape initiale peut être ajoutée : la reconnaissance d'une surface par le microorganisme.

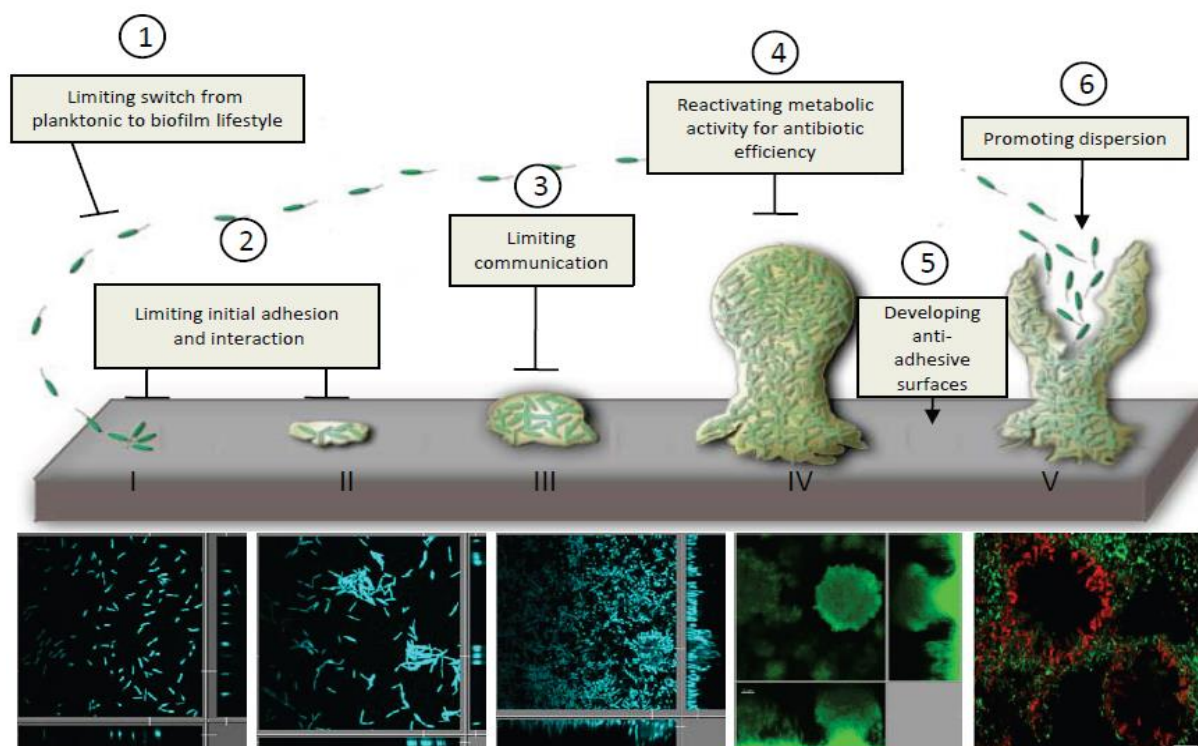


Figure 7 : Schéma illustrant les différentes étapes de développement d'un biofilm de *P. aeruginosa* avec au-dessous ces mêmes étapes observées au microscope confocal avec un marquage DAPI (I à III), un marquage GFP (IV) et un marquage BacLigh® (V) (Bordi et de Bentzmann, 2011).

2.1 Reconnaissance d'une surface.

Dans l'environnement, les surfaces disponibles sont généralement recouvertes par un film conditionnant. Ce film est constitué par la précipitation et/ou l'adsorption de particules organiques et inorganiques contenues dans l'eau circulante, par action de la gravité et/ou des flux hydrodynamiques. Lorsqu'il est issu d'eaux naturelles, telles que des eaux de rivières ou d'océan, le film conditionnant est majoritairement composé de glycoprotéines, de substances humiques, de protéines, de lipides, d'acides nucléiques, de polysaccharides et d'acides aminés aromatiques pour la fraction organique (Garg *et al.*, 2009). La fraction inorganique est quant à elle généralement composée de sels minéraux et d'hydroxydes métalliques (Chen *et al.*, 2010). Dans des milieux pauvres en nutriments, caractéristiques des eaux potables ou des eaux minérales naturelles, les surfaces concentrant les substrats disponibles sous forme de film

conditionnant constituant pour les microorganismes des lieux d'implantation et de développement idéaux. La présence de ce film est susceptible de favoriser l'adhésion bactérienne en offrant de potentiels points d'ancrage aux microorganismes et/ou en modifiant les propriétés de surface (charge, potentiel et tension) du matériau sur lequel il se dépose (Garret *et al.*, 2008). Le type et le degré de modifications sont fortement dépendants du matériau concerné et de la composition du film conditionnant (Schneider, 1996).

Le transport des bactéries vers une surface repose sur le mouvement Brownien ou la mobilité propre des bactéries. Les bactéries présentent différents types de mobilité selon les caractéristiques du milieu dans lequel elles se trouvent. Dans des milieux hydriques présentant une faible viscosité, elles ont recours à la nage ou « swimming » assurée par un ou des flagelles (Conrad, 2012). Leur capacité à se mouvoir dépend du fonctionnement de cet appendice. Il peut être modulé suivant les signaux environnementaux détectés par la cellule tels que la présence de certains métabolites ou de molécules signal caractéristiques de systèmes de communication cellulaire, la lumière, la température, le pH, l'oxygène, la salinité du milieu ou la présence de champs magnétiques (Krell *et al.*, 2011). Ce système de modulation, appelé chimiotactisme, permet à la bactérie de s'adapter rapidement aux changements de son environnement. La détection de signaux attractants ou repoussants active une cascade de phosphorylation qui va conduire à l'interaction de protéines avec le moteur du flagelle. Cette interaction aboutit à une modification de la mobilité de la bactérie ou à une modulation de sa vitesse. Le chimiotactisme peut participer à la reconnaissance d'une surface : les bactéries libèrent des protons et des molécules signal dans leur environnement dont la dispersion atteste de l'absence de surface, ou, à l'inverse, dont la concentration confirme sa proximité (Costerton *et al.*, 1995).

La bactérie et la surface reconnue interagissent entre elles. Dans un premier temps, des interactions non spécifiques d'ordre physicochimique sont induites. Elles sont ensuite suivies d'interactions biologiques plus spécifiques. Ces différentes interactions définissent deux phases d'adhésion : la phase d'adhésion dite réversible et la phase d'adhésion dite irréversible.

2.1 Adhésion réversible.

L'adhésion réversible a lieu lors des premiers contacts entre bactérie et surface, sa durée est de l'ordre de quelques secondes. L'adhésion dépend des forces d'attraction ou de répulsion s'exerçant entre deux éléments. Dans le cas de l'adhésion de bactéries à une surface, ces forces peuvent être caractérisées par un modèle mathématique nommé « théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek » (théorie DLVO). Ce modèle a été initialement développé pour décrire les interactions entre une particule colloïdale et une surface puis a été extrapolé à la description

de l'adhésion bactérienne (Hermansson, 1999). D'après cette théorie, le total des interactions s'exerçant entre une surface et une bactérie correspond à la somme des liaisons de van der Waals (VDW) et des interactions électrostatiques (Poortinga *et al.*, 2002). Ces forces physicochimiques relèvent d'interactions dites non spécifiques, également qualifiables de passives dans le sens où elles sont indépendantes de l'activité de la bactérie. A une certaine distance de la surface, les forces électrostatiques sont prédominantes, ce sont elles qui entrent en jeux les premières dans l'adhésion. Une fois la distance entre la bactérie et la surface réduite à quelques nanomètres, les liaisons de VDW prévalent, les mouvements Brownien ne suffisent plus aux bactéries pour se libérer de l'attraction à la surface : elles y adhèrent de façon irréversible (Hori et Matsumoto, 2010).

Cependant dans l'environnement, les microorganismes et les surfaces inertes portent majoritairement des charges de surface négatives favorisant les forces de répulsions électrostatiques (Wilson *et al.*, 2001 ; Poortinga *et al.*, 2002; Dunne, 2002). Suivant leur intensité, ces forces de répulsions peuvent être surmontées par des interactions moléculaires dites spécifiques ou actives car dépendantes de l'activité de la bactérie. Ces interactions spécifiques sont généralement assurées par des couples récepteur/ligand, des lectines et/ou des adhésines, pouvant être portés par des éléments de la surface externe de la membrane des microorganismes tels que certains appendices liés à la mobilité, à l'image du flagelle ou des pili de type IV (Dunne, 2002). Ces éléments sont susceptibles d'entrer en action lorsque la bactérie se trouve à moins d'une dizaine de nanomètres de la surface permettant l'exploration de l'environnement proche et la reconnaissance de zones d'adhésion spécifiques par des phases successives d'attachement/détachement de la bactérie (Garnett et Matthews, 2012).

Cette exploration peut également être assurée par d'autres comportements telle que la rotation de la bactérie autour de son axe polaire porteur du flagelle appelé « spinning » (Conrad *et al.*, 2011), l'entrée en vibration de la bactérie ou les mobilités de surface de type essaimage ou « twitching » ou de type grouillement ou « swarming » (Petrova et Sauer, 2012). Ces phénomènes peuvent fortement contribuer à l'élaboration des fondations de l'architecture du biofilm (tableau 9). Une mobilité de surface réduite conduit à un biofilm avec une architecture complexe plus étendue en favorisant l'accumulation de biomasse (Petrova et Sauer, 2012). L'adhésion, renforcée par ces interactions spécifiques, perd son caractère transitoire au profit d'un caractère stable dit irréversible.

Tableau 9 : Caractéristiques des principaux types de mobilité de *P. aeruginosa* et de leurs rôles dans la formation de biofilm.

Mobilité	Définition et caractéristiques	Principaux rôles dans la formation du biofilm
Nage Swimming	mobilité assurée par le ou les flagelles permettant un déplacement rapide (environ 60 $\mu\text{m/s}$) d'un individu parallèlement et à certaine distance d'une surface (Conrad <i>et al.</i> , 2011 ; Conrad, 2012).	- rencontre avec la surface (Conrad, 2012) - implication du flagelle dans l'interaction entre la bactérie et la surface (Toutain <i>et al.</i> , 2007) - formation des microcolonies (O'Toole et Kolter, 1998). - formation de structures typiques de colonies matures (Barken <i>et al.</i> , 2008)
Essaimage Twitching	déplacement lent par élongation/rétraction des pili de type IV permettant l'exploration de la surface (Petrova et Sauer, 2012).	- implication dans l'exploration et la colonisation de la surface par expansion sous forme d'un réseau maillé (Gloag <i>et al.</i> , 2013) - formation des microcolonies (O'Toole et Kolter, 1998). - formation de structures typiques de colonies matures (Barken <i>et al.</i> , 2008)
Grouillement Swarming	processus par lequel les bactéries peuvent rapidement se mouvoir de façon coordonnée sur une surface humide nécessitant la présence d'un flagelle fonctionnel, de pili de type IV et la production de biosurfactant (rhamnolipide) (Verstraeten <i>et al.</i> , 2008).	- contribution aux premières étapes de formation du biofilm (Shrout <i>et al.</i> , 2006).
Rotation Spinning	rotation d'une bactérie attachée à une surface à son extrémité polaire à une fréquence proche de 5 Hz (Conrad, 2012).	- implication dans la structuration du biofilm en favorisant les processus d'attachements/détachements nécessaires à l'exploration de la surface (Conrad <i>et al.</i> , 2011).

2.2 Adhésion irréversible.

L'attachement irréversible des bactéries sur une surface conduit à une augmentation locale de la densité cellulaire. Cette augmentation provoque la concentration de molécules signal, naturellement produites par les bactéries, induisant un système de communication cellulaire sophistiqué appelé le « quorum-sensing ». Le fonctionnement de ce système est lié à la production de molécules diffusibles induite à forte densité cellulaire (Petrova et Sauer, 2012). L'accumulation de ces molécules constitue un signal ayant la propriété, après détection par les protéines réceptrices appropriées, d'activer ou d'inhiber l'expression d'un panel de gènes cibles (Lee et Zhang, 2014).

P. aeruginosa possède trois voies de « quorum-sensing » (tableau 10) basées sur des molécules signal distinctes (Shirtliff *et al.*, 2002). L'induction de ces systèmes de communication permet l'action coordonnée d'un ensemble de cellules et est essentiel à la formation de biofilm mature chez *P. aeruginosa*. Le « quorum-sensing », couplé à l'entrée en contact avec une surface, conduit à l'activation d'une cascade de signaux d'adaptation. L'expression des gènes codant pour des éléments impliqués dans la mobilité est inhibée tandis que celle de gènes nécessaires à la production de protéines de surface et à l'excrétion de substances exopolymériques (EPS) est favorisée (Garret *et al.*, 2008).

Tableau 10 : Principales voies de « quorum-sensing » chez *P. aeruginosa* et exemples de leurs gènes cibles.

Voie de « quorum-sensing » (synthase/activateur de transcription)	Molécule signal	Exemples de gènes cibles	Référence
Las (lasI/LasR)	3-oxo-C12-HSL	<i>lasB</i> (élastase B) <i>lasA</i> (sérine protéase) <i>aprA</i> (alkaline protéase) <i>toxA</i> (exotoxine A) <i>xcp</i> (éléments du système de sécrétion de type II) <i>rhlR</i> (activateur de transcription de la voie Rhl) <i>lasI</i> (synthase de la voie Las) <i>pqsH</i> (molécule signal de PQS)	Shirliff <i>et al.</i> , 2002
Rhl (RhlI/RhlR)	C4-HSL	<i>rhlAB</i> (rhamnolipides) <i>lasB</i> (élastase B) <i>aprA</i> (alkaline protéase) <i>phzABCDEFG</i> et <i>PhzM</i> (pyocyanines) <i>lecA</i> (lectines) <i>rhlI</i> (synthase de la voie Rhl)	Shirliff <i>et al.</i> , 2002
Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)	2-heptyl-3-hydroxy-4- quinolone	<i>phz</i> (pyocyanine) <i>lecA</i> (lectine) <i>rhlI</i> (synthase de la voie Rhl)	Lee et Zhang, 2014

HSL : Homosérine Lactone.

La transition de l'état mobile à l'état adhérent dit sessile est indispensable à la stabilisation des futurs agrégats cellulaires et à l'optimisation de l'utilisation des ressources à disposition de la bactérie (Guttenplan et Kearns, 2013). L'énergie dédiée à la synthèse du flagelle et à la mobilisation des protons ou du sodium nécessaire à son fonctionnement peut ainsi être employée à la formation et au développement du biofilm (Guttenplan et Kearns, 2013). La production d'EPS par les microorganismes consolide leur adhésion sur les surfaces disponibles. Une fois adhérente sur la surface, les bactéries se multiplient, la croissance clonale et les interactions intercellulaires stables étant conjointement indispensables à la formation de microcolonies (Stanley et Lazazzera, 2004). L'adhésion de bactéries mobiles à des bactéries adhérentes à une surface, ou coaggrégation, participe à l'élaboration d'un biofilm multi-espèces. Pour les bactéries provenant d'eau douce, la coaggrégation s'effectue via des interactions protéines/saccharides durant la phase de croissance stationnaire et est sous contrôle environnemental (Rickard *et al.*, 2003).

La durée de cette étape d'adhésion irréversible est de l'ordre de quelques heures, elle signe la fin de l'adhésion en tant que telle et le début des étapes de maturation du biofilm.

2.3 Etapes de maturation.

Cette phase de développement est caractérisée par une augmentation de la production de substances exopolymériques (EPS). La nature et la fonction des EPS produites sont dépendantes des conditions environnementales telles que la nature des sources de carbone disponibles (Shrout *et al.*, 2006 ; Huyn *et al.*, 2012) ou les flux hydrodynamiques présents (Purevdorj *et al.*, 2002). Elles conduisent à la formation d'une matrice extracellulaire (MEC) composée en

majorité d'eau, d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et de biosurfactant (Ma *et al.*, 2009). La MEC entoure les microorganismes piégeant les microcolonies qui en se développant aboutissent à la formation de mosaïque clonale et à la création de macrocolonies. La structuration de la MEC s'élabore au fur et à mesure du développement du biofilm et peut conduire à deux formes de biofilm selon les conditions de développement. Dans des conditions favorables à son développement, incluant une source de carbone de type glucose (tableau 11), le biofilm présente une architecture tridimensionnelle complexe et est dit différencié. A l'inverse en absence de source de carbone de type glucose, le biofilm présente une structure simple, plate et est dit indifférencié (Parsek et Tolker-Nielsen, 2008).

Tableau 11 : Exemples d'épaisseur de biofilms de *P. aeruginosa* développés en conditions semi-dynamiques dans différentes conditions de culture et analysés au microscope confocal.

Souches	Conditions de culture			Age	Epaisseur moyenne (µm)	Référence
	Milieu	Source de carbone	Temp. (°C)			
PAO1	milieu minimum	sodium glutamate (9 mM) glycérol (50 mM)	37	2 jrs	95 ± 20	Sarkisova <i>et al.</i> , 2005
FRD1 (clinique)	milieu minimum	sodium glutamate (9 mM) glycérol (50 mM)	37	2 jrs	95 ± 21	Sarkisova <i>et al.</i> , 2005
PAO1	milieu FAB modifié	glucose (0,3 mM)	30	4 jrs	42,82 ± 2,74	Yang <i>et al.</i> , 2007
PAO1	milieu minimum	glucose (0,5 mM)	22	4 jrs	334 ± 34	Hunt <i>et al.</i> , 2004
ERC1 (env.)	MOPS	glucose (0,5 mM)	22	4 jrs	117,13 ± 11,54	Xu <i>et al.</i> , 1998
PAO1	milieu minimum	glutamate (0,9 mM)	22	6 jrs	29,2 ± 8,3	Southey-Pillig <i>et al.</i> , 2005

Env. : Environnementale, FAB : Fastidious Anaerobe Broth, MOPS : Morpholinopropane Sulfonate, Temp. : Température.

Au cours de l'accumulation des exopolymères synthétisés par les bactéries, la MEC gagne en épaisseur. Elle se creuse de canaux qui permettent l'acheminement des nutriments et de l'oxygène dans les différentes couches du biofilm et l'export des différents déchets produits dans l'environnement (Filloux et Vallet, 2003). Sa structure compacte permet principalement les transports par diffusion, contrainte conduisant à la formation de gradient de nutriments, de pH, de potentiel redox, de forces ioniques et d'oxygène (Flemming, 2001). L'oxygène étant consommé par les microorganismes aérobies plus vite qu'il ne diffuse à travers la matrice, les couches profondes du biofilm, à partir d'une cinquantaine de micromètres de profondeur, relèvent de conditions microanaérobies (Flemming, 2001). De la même façon, les microorganismes des couches superficielles ont un accès facilité aux nutriments nécessaires à leur activité. Les microorganismes au sein d'un biofilm ne présentent donc pas le même état métabolique et/ou physiologique selon leur emplacement au sein de la matrice. Cette hétérogénéité métabolique participe aux propriétés de résistance du biofilm (Borriello *et al.*,

2004). Ces gradients conduisent également à la création de niches écologiques au sein du biofilm (Mann et Wozniak, 2012). Les agrégats de microorganismes présents au sein de la MEC sont ainsi séparés par un réseau de canaux et par de nombreux espaces vides aboutissant à une structure poreuse.

Le deuxième stade de maturation est défini par l'augmentation de la complexité de la structure tridimensionnelle du biofilm. Des structures dites « champignons » constituées d'une tête et d'un pilier se forment alors. Elles sont constituées de l'accumulation d'individus mobiles, prenant une forme de coiffe, surmontant un regroupement d'individus non-mobiles constituant le pilier de la structure (Barken *et al.*, 2008). Elles sont caractéristiques d'un biofilm mature dont la source de carbone est le glucose (Shrout *et al.*, 2006) et apparaissent après plusieurs jours de développement. Les phases de maturation conduisent à la phase finale de dispersion.

2.4 Dispersion.

Deux grands types de dispersion peuvent être distingués : la dispersion active et la dispersion passive.

La dispersion active correspond à l'ultime phase de développement du biofilm conduisant à la libération d'éléments planctoniques mobiles. Elle est caractérisée par la formation d'un creux dans la tête de la structure « champignon ». Les bactéries mobiles sont attirées dans cette cavité grâce à la forte affinité existant entre les pili de type IV et l'ADN extracellulaire (ADNe) constitutif de la MEC formant la coiffe. L'ouverture de la tête de la structure permet leur libération dans l'environnement (Van Schaik *et al.*, 2005) et est le résultat de sa dégradation par différentes enzymes. Ces enzymes peuvent être produites par les microorganismes constitutifs du biofilm ou être issues de la lyse de bactéries due à l'action de bactériophages (Garnett et Matthews, 2012). Ces enzymes peuvent dégrader les exopolymères supportant la matrice extracellulaire, voire de façon plus spécifique les exopolysaccharides. Des molécules aux propriétés similaires peuvent également jouer ce rôle de dégradation : c'est notamment le cas des rhamnolipides, biosurfactants produits par *P. aeruginosa* (Garnett et Matthews, 2012). La phase de dispersion active peut être induite par des conditions environnementales devenues défavorables au développement telles qu'une carence en nutriments (carbone, azote, phosphore ou fer) ou en oxygène, ou l'accumulation de toxines ou de déchets (Martinez et Vadyvaloo, 2014). De la même façon, la présence soudaine de nutriments à concentrations relativement élevées peut également provoquer la dispersion du biofilm (Flemming, 2001).

La dispersion passive correspond à l'arrachage de morceaux de biofilm. Cet arrachage résulte de l'érosion du biofilm par les forces de frottements exercées par les flux hydrodynamiques, de l'abrasion par les particules contenues dans l'eau circulante ou de la prédation par d'autres microorganismes, tels que les amibes ou les bactériophages. Ces détachements sont indépendants de l'activité des bactéries et peuvent survenir à n'importe quelle phase du cycle de développement du biofilm (Hall-Stoodley et Stoodley, 2005 ; Kaplan, 2010).

Les bactéries mobiles libérées sont à même de coloniser de nouvelles surfaces et d'entrer dans un nouveau cycle de formation de biofilm. Le biofilm resté sur la surface continue de se développer et de relâcher des microorganismes.

Chacune des phases de développement du cycle de vie du biofilm de *P. aeruginosa* est caractérisée par des événements d'ordres physicochimiques et/ou biologiques précis. Ces événements incluent notamment la synthèse des différents éléments constitutifs du biofilm. Chacun de ces éléments joue un ou plusieurs rôles majeurs dans la formation et le développement du biofilm.

3. Composants caractéristiques du biofilm de *P. aeruginosa*.

Le biofilm est constitué de deux grands éléments (figure 8) : les microorganismes, organisés en microcolonies et la matrice extracellulaire (MEC) (Costerton *et al.*, 1995). Cette matrice extracellulaire prend la forme d'un réseau de structure tridimensionnelle complexe (Costerton *et al.*, 1995). Elle est avant tout une interface entre les microcolonies et l'environnement, permet l'attachement au surface, facilite les interactions entre cellules ou sous-population (échanges de matériel génétique, de signaux chimiques ou de produits métaboliques) et procure une protection contre les attaques chimiques (antibiotiques et biocides), mécaniques (forces hydrodynamiques ou abrasion) et thermiques (choc thermique). Elle est majoritairement constituée d'eau, élément indispensable à la survie des microorganismes au sein du biofilm. Les mécanismes régissant sa rétention et sa mobilité au sein de la matrice ne sont pas encore bien déterminés (Flemming, 2001). L'eau permet l'acheminement des nutriments via les canaux sillonnant la matrice et est essentielle à la physiologie et au maintien de l'intégrité des cellules et du biofilm : elle prévient le tassement de la MEC en maintenant une certaine distance entre les différents exopolymères. La distribution de ces exopolymères au sein de la matrice est hétérogène et variable au cours du cycle de développement du biofilm (Sutherland, 2001). Ces exopolymères sont principalement représentés par des exopolysaccharides, de l'ADN extracellulaire (ADNe), des protéines et des biosurfactants.

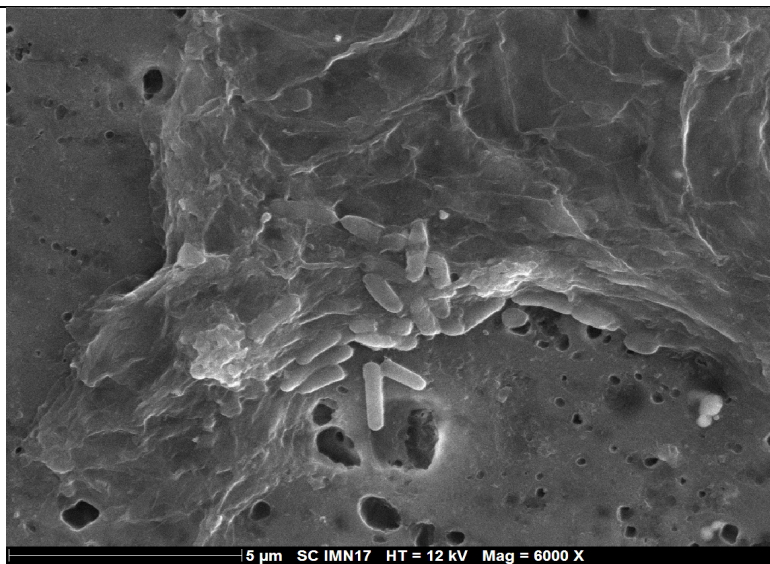


Figure 8 : Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm de 24 h d'une souche environnementale de *P. aeruginosa* formé sur un coupon de polychlorure de vinyle surchloré.

3.1 Les exopolysaccharides.

Les exopolysaccharides sont des éléments cruciaux des étapes d'initiation et de maturation du biofilm (tableau 12). Ils sont porteurs de sites de liaisons non-covalentes dont l'abondance est susceptible de conduire à la génération de forces d'adhésion pouvant être supérieures à celles engendrées par un petit nombre de liaisons covalentes (Hori et Mastumoto, 2010). Les exopolysaccharides tiennent différents rôles, liés à leur composition et leur organisation, dans la formation et le développement de biofilm. Ils favorisent l'attachement des cellules sur une surface, leur production aboutissant à l'inhibition des éléments nécessaire à la mobilité. Ils permettent la structuration et le maintien du biofilm, les interactions entre leurs chaînes carbonées ou avec d'autres molécules conduisent à la création d'un réseau complexe structurant la matrice. Ils capturent et retiennent l'eau présente dans l'environnement, l'obtention d'une matrice hautement hydratée permettant de prévenir les risques de dessiccation (Flemming, 2001). Ils participent à la protection des microcolonies contre les attaques chimiques, mécaniques et thermiques et contre les systèmes de défense des hôtes infectés (Fux *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* a la capacité de synthétiser au moins trois exopolysaccharides : l'alginate, le Psl (Polysaccharide synthesis locus) et le Pel (PELlicle locus) (Ma *et al.*, 2009; Schurr, 2013).

3.1.1 L'alginate.

L'alginate, caractérisé en 1973 par Evans et Linker, est le premier exopolysaccharide à avoir été identifié chez *P. aeruginosa*. Il s'agit d'un polymère acétylé de haut poids moléculaire

constitué de l'association non répétitive de monomères d'acides guluroniques et mannuroniques (Ryder *et al.*, 2007).

La production d'alginate est caractéristique des souches cliniques isolées de patients atteints de mucoviscidose. Dans ce contexte, ces souches subissent une altération de leur phénotype qui conduit à l'observation de colonies d'apparences visqueuses sur milieu gélosé alors qualifiées de mucoïdes. Près de 85 % des souches de *P. aeruginosa* d'origine clinique (Mulcahy *et al.*, 2008) et environ 1 % des souches d'origine environnementale (Stapper *et al.*, 2004) présentent ce phénotype. Ce changement est lié à une surproduction d'alginate notamment induite par des conditions anaérobies. Il procure aux bactéries un avantage sélectif dans l'environnement hostile des voies pulmonaires en leur offrant une protection adaptée contre les agents de défense du système immunitaire (lymphocytes, phagocytes, action des cellules ciliées du tractus respiratoire) et les traitements antibiotiques (Ghafoor *et al.*, 2011; Stapper *et al.*, 2004).

Jusqu'au début des années 2000, l'alginate était considéré comme le principal exopolysaccharide produit par *P. aeruginosa*, la majorité des souches étudiées jusqu'alors étant essentiellement d'origine clinique. L'analyse de mutants des souches PAO1 et PA14 incapables de synthétiser de l'alginate a montré que ces souches conservent leur capacité à former et à maintenir un biofilm suggérant la production d'autres exopolysaccharides (Wozniak *et al.*, 2003 ; Stapper *et al.*, 2004).

3.1.2 Le Psl.

Psl (Polysaccharide synthesis locus) est majoritairement constitué de glucose, de mannose et de galactose et contient également des traces de rhamnose, de xylose et de N-acetylglucosamine (Ma *et al.*, 2007). Le mannose, le glucose et le rhamnose forment une structure pentasaccharide répétée (Byrd *et al.*, 2009).

Psl intervient tout au long du cycle de développement du biofilm des souches non mucoïdes de *P. aeruginosa* : il est indispensable aussi bien à sa formation qu'à sa maturation et son maintien (tableau 12). L'étude d'un mutant *pslAB* (mutation sur les deux premiers gènes du locus) dépourvu des enzymes nécessaires à la synthèse de Psl montre que celui-ci est incapable d'initier la formation d'un biofilm sur une surface, qu'elle soit biotique ou abiotique (Jackson *et al.*, 2004). Cet effet est indépendant des sources de carbone disponibles : qu'il s'agisse de glucose, de mannose, de glycérol, de glutamate ou de citrate, le mutant PAO1 Δ *pslAB* montre une capacité à former un biofilm dix fois inférieure à celle de PAO1 (Ma *et al.*, 2006).

Les rôles de structuration et de maintien de la matrice extracellulaire joués par Psl sont notamment dus à son ancrage sous forme hélicoïdale à la surface des cellules bactériennes. Cette distribution favorise les interactions entre deux cellules proches, son altération par des cellulases, enzymes ciblant les liaisons β -1,3 or β -1,4 des glucanes, entraîne un défaut de maintien du biofilm (Ma *et al.*, 2009). La production de Psl, associée à la mobilité due au fonctionnement des pili de type IV, conduit à la formation de fibres de Psl sur la surface explorée par les bactéries. Ces fibres forment un réseau maillé guidant plus spécifiquement les cellules vers certaines zones et permettent une formation efficace de biofilm (Zhao *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013). Les souches incapables de produire ces fibres doivent produire de plus importante quantité de Psl pour conserver l'intégrité structurelle de leurs microcolonies (Wang *et al.*, 2013).

La présence de Psl au sein de la matrice extracellulaire augmente son élasticité et sa réticulation (Chew *et al.*, 2014). Cette augmentation de la réticulation contribue à renforcer la structure de la matrice extracellulaire et à maintenir l'architecture du biofilm. Elle contribue également à la ségrégation de *P. aeruginosa* au sein d'un biofilm multi-espèces par formation d'une barrière physique (Chew *et al.*, 2014). La distribution de Psl au sein de la matrice extracellulaire évolue au cours des étapes de formation du biofilm : au sein d'un biofilm différencié, caractérisé par une structure tridimensionnelle complexe, Psl est majoritairement localisé en périphérie des macrocolonies mais est peu présent au centre de celles-ci où se forme la cavité nécessaire à la phase de dispersion (Ma *et al.*, 2009).

La présence de Psl permet également le recrutement de bactéries en suspension dans l'environnement extérieur en offrant un point d'ancrage à leurs structures adhésives tels que les pili de type IV (Wang *et al.*, 2013).

3.1.3 Le Pel.

Pel (PEllicle locus) est l'exopolysaccharide de *P. aeruginosa* le moins bien caractérisé à ce jour. Il est essentiellement composé d'un assemblage de polysaccharides riches en glucose, sa composition exacte n'étant pas connue (Colvin *et al.*, 2011).

Pel est plus particulièrement impliqué dans la formation de biofilm à l'interface air/liquide qualifié de pellicule. Sa synthèse est indispensable au développement de biofilm par la souche PA14, cette souche étant incapable de synthétiser d'autres exopolysaccharides (Friedman et Kolter, 2004), mais n'est pas nécessaire au maintien de son biofilm (Colvin *et al.*, 2011). La synthèse de Pel intervient plus spécifiquement lors des phases de maturation du biofilm, l'inhibition de la capacité de la souche de référence PAO1 à produire du Pel

n'empêchant pas son adhésion à la surface (Ghafoor *et al.*, 2011). Sa capacité à interagir avec l'ADN extracellulaire composant la matrice favorise les interactions entre cellules bactériennes, aboutissant à une augmentation de la densité du biofilm (Ghafoor *et al.*, 2011). Pel aurait également la capacité d'interagir avec Psl : ces interactions conduiraient à une augmentation des forces d'adhésion en certains points (Cooley *et al.*, 2013). La présence de Pel a ainsi pu être corrélée à une augmentation de la viscosité de la matrice extracellulaire combinée à une diminution de sa réticulation (Wang *et al.*, 2013). Pel contribuerait également aux propriétés de résistance du biofilm contre les antibiotiques de type aminoglycosides à l'aide d'un mécanisme non identifié mais supposé comme étant lié à la fixation et la séquestration des molécules actives (Colvin *et al.*, 2011).

3.2 L'ADN extracellulaire.

L'ADN extracellulaire (ADNe) est libéré suivant deux types de mécanismes. Les mécanismes indépendants du « quorum-sensing » seraient responsables du maintien de la libération de l'ADNe à un niveau basal grâce à l'induction de la lyse des cellules par des prophages. Cette lyse serait sous le contrôle du flagelle et des pili de type IV. Les mécanismes dépendants du « quorum-sensing » permettraient l'induction de la lyse des cellules via la synthèse de facteurs de virulence tels que les phénazines sous contrôle des voies Rhl et PQS (Das *et al.*, 2013).

La distribution de l'ADNe au sein du biofilm varie selon la phase de développement considérée. Au sein de biofilms de PAO1 développés en conditions semi-dynamiques et âgés de 2 jours, l'observation au microscope confocal montre que l'ADNe est majoritairement présent à la surface des microcolonies mais est également retrouvé à l'intérieur de celles-ci et est distribué sur la surface d'adhésion. Pour ces mêmes biofilms âgés de 4 jours, l'ADNe est majoritairement présent au niveau de la surface de développement et dans les piliers des structures « champignons », caractéristiques d'un biofilm mature : il est plus particulièrement concentré à la frontière entre les piliers et les têtes de ces structures. Pour ces mêmes biofilms âgés de 6 jours, l'ADNe est présent dans l'intégralité des structures « champignons » (Allesen-Holm *et al.*, 2006).

L'ADNe intervient lors de l'adhésion et participe au maintien de la structure de la matrice extracellulaire (tableau 12). Il est indispensable au déroulement des premières étapes de formation du biofilm de *P. aeruginosa*. L'exposition de cultures planctoniques de PAO1 à une enzyme, la DNase I, dégradant l'ADN double brin, conduit à l'inhibition de la formation du biofilm. L'exposition de biofilms âgés de 12 h, 36 h ou 60 h à cette même enzyme ne

provoque que leur dispersion partielle tandis que l'exposition de biofilms plus matures, âgés de 84 h, n'a pas ou peu d'effet sur leur structure (Whitchurch *et al.*, 2002). L'action stabilisatrice de l'ADNe provient notamment de sa capacité à induire des forces d'interactions de type van der Waals ou acide/base avec les autres éléments constitutifs de la matrice ou des cellules (Das *et al.*, 2010) tels que le Pel (Colvin *et al.*, 2011) ou la pyocyanine (Das *et al.*, 2015). L'ADNe intervient dans la viscoélasticité du biofilm en contribuant à la relaxation des contraintes subies par la matrice extracellulaire lors de l'exposition à des flux hydrodynamiques (Peterson *et al.*, 2013). Il peut également participer aux propriétés de résistance du biofilm développé par *P. aeruginosa*. En raison de son caractère polyanionique, il peut se lier aux molécules antibiotiques positivement chargées, tels que les aminoglycosides ou les peptides antimicrobiens, conduisant à leur inactivation. Cet effet est temporaire du fait de la saturation de l'ADNe disponible mais permet de retarder l'action des antibiotiques et participe ainsi à l'augmentation des capacités de tolérance du biofilm aux substances actives (Chiang *et al.*, 2013).

L'ADNe peut présenter des rôles accessoires liés à sa composition ou à ses propriétés physicochimiques. Dans des conditions de stress nutritionnel, il peut faire office de nutriment et être utilisé comme source de phosphore, de carbone et/ou d'azote (Finkel et Kolter, 2001). Cette utilisation a été démontrée pour plusieurs souches de *P. aeruginosa*. Sa dégradation est assurée par la DNase EddB (PA3909) dont la synthèse est induite pendant la croissance stationnaire en cas de concentrations en phosphore limitées. Elle atteint un maximum pour une concentration en phosphore de 100 μM et est inhibée pour des concentrations supérieures ou égales à 400 μM . Bien que l'ADNe puisse faire office de source de phosphore ou d'azote, il pallie plus difficilement à l'absence de carbone (Mulcahy *et al.*, 2010).

3.3 Les protéines.

La synthèse des protéines dépend de la phase de développement du biofilm considérée. L'étude de l'évaluation des protéines associées à la matrice extracellulaire au cours du développement du biofilm de la souche d'origine clinique *P. aeruginosa* ATCC 27853⁵ a montré que sur les 389 protéines identifiées, 54 présentaient un changement significatif de leur abondance (Zhang *et al.*, 2015). Ces protéines concernaient plus particulièrement la réponse et la résistance au stress, l'acquisition de nutriments, le pouvoir pathogène et la stabilité du biofilm. La famille de protéines la plus représentée regroupait les protéines impliquées dans le

⁵ ATCC : American Type Culture Collection

La souche clinique *P. aeruginosa* ATCC 27853 est fréquemment utilisée pour tester l'efficacité de substances antimicrobiennes (Zhang *et al.*, 2015).

transport d'acides aminés et le métabolisme, telle que la porine OmpA dont l'abondance était multipliée par quatre au cours du développement de biofilm. Au cours des premières phases de développement (de 12 h à 48 h) la majorité des protéines présentait une augmentation de leur abondance. A l'inverse, entre 48 h et 96 h de développement une majorité des protéines présentait une diminution de leur abondance. C'était notamment le cas de la protéine CpbD (Chitin-binding protein), impliquée dans l'adaptation de la cellule aux gradients de nutriments, la tolérance au stress et la protection contre les prédateurs, de la protéine HspC2, impliquée dans la résistance aux chocs thermiques, ou encore de la protéine IscA (iron-sulfur cluster), impliquée dans la fixation du fer (Zhang *et al.*, 2015). Cette fixation est nécessaire à l'assemblage d'un cluster de protéines intervenant notamment dans le métabolisme des sucres, la modification et la traduction d'ARN, la réplication et la réparation d'ADN et la régulation de l'expression des gènes (Landry *et al.*, 2013).

Dans le biofilm mature de *P. aeruginosa*, la synthèse des protéines est stratifiée. Cette stratification résulte de l'hétérogénéité métabolique induite notamment par les gradients d'oxygène formés au cours de la structuration de la matrice extracellulaire. Une étude cartographiant la configuration spatiale de la synthèse de protéines au sein de biofilms de la souche de référence PAO1 a montré que cette synthèse était limitée aux cellules bactériennes se trouvant jusqu'à 30 µm de profondeur au sein de biofilms développés en conditions semi-dynamiques (150 µm d'épaisseur) et jusqu'à 60 µm de profondeur au sein de biofilms développés en conditions statiques (300 µm d'épaisseur). Cette zone de métabolisme actif correspond à la zone de diffusion de l'oxygène au sein du biofilm, dont l'étendue a été estimée jusqu'à environ 50 µm (Werner *et al.*, 2004). Des résultats similaires ont été obtenus pour des biofilms de la souche *P. aeruginosa* ERC1 isolée d'eaux industrielles. La zone de diffusion de l'oxygène, utilisé pur, s'étendait jusqu'à 46 µm de profondeur au sein de biofilms ayant une épaisseur moyenne comprise entre 117 et 151 µm. La dimension de cette zone concordait avec celle de la zone métaboliquement active (Xu *et al.*, 1998). Des limitations en oxygène ont également pu être mise en évidence au sein même des agrégats bactériens (Wessel *et al.*, 2014).

Le biofilm de *P. aeruginosa* comprend de nombreuses adhésines. Ces dernières sont distinguées selon leur structure en deux familles. Les adhésines dites fimbriales regroupent les adhésines portées par le flagelle, les pili de la voie CU et les pili de type IV impliquées dans l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques. Les adhésines dites non-fimbriales correspondent à des protéines mono ou oligomériques qui ne sont pas assemblées sous forme de fibrilles mais sécrétées par la bactérie et qui sont également impliquées dans l'adhésion (Soto et Hultgren, 1999 ; Gerlach et Hensel, 2007). Elles peuvent avoir un rôle d'ordre structurel.

C'est notamment le cas de la protéine CdrA (cyclic diguanylate-regulated TPS partner A), propre au mode de vie sessile, dont l'abondance est plus forte au cours des premières étapes de formation du biofilm (Zhang *et al.*, 2015) et qui est impliquée dans la stabilisation de la matrice extracellulaire (Borlee *et al.*, 2010). Cette activité stabilisatrice provient de sa capacité à interagir avec le Psl, favorisant l'association de cet exopolysaccharide avec les microcolonies et les autres constituants de la matrice extracellulaire. En l'absence de CdrA fonctionnelles, le Psl est faiblement lié aux éléments du biofilm et peut être en partie libéré dans un milieu comprenant un flux hydrodynamique (Borlee *et al.*, 2010).

Certaines enzymes extracellulaires peuvent également avoir un impact important sur la composition physicochimique de la matrice extracellulaire. La surexpression de certaines hydrolases, connues pour leur contribution à la virulence et à la nutrition de *P. aeruginosa*, peut participer à l'augmentation de l'hydrophobicité et de la viscosité de la matrice extracellulaire : la surexpression de la lipase LipC favorise l'agrégation cellulaire tandis que la surexpression conjointe de l'élastase LasB et de l'estérase EstA conduit à l'augmentation de la production de biosurfactants et à la diminution de la synthèse d'alginate chez des souches mucoïdes (Tielen *et al.*, 2010). L'abondance de LasB au sein de la matrice extracellulaire est multipliée par trois au cours du développement du biofilm (Zhang *et al.*, 2015).

3.4 Un biosurfactant : le rhamnolipide.

Le rhamnolipide est une molécule amphiphile composée d'un lipide couplé à un sucre mono ou dirhamnose (Caiazza *et al.*, 2005). Cette composition lui confère des propriétés tensioactives telles que la réduction des tensions de surface, la génération d'émulsion ou la pseudosolubilisation de substrats insolubles, apportant à *P. aeruginosa* la capacité de métaboliser une plus grande variété de sources de carbone (Chrzanowski *et al.*, 2012). Sa synthèse est dépendante de la nature des sources d'azote disponibles. Elle est favorisée par le glutamate, l'aspartate, la proline ou l'histidine et est à l'inverse inhibée par l'asparagine, la glutamine et l'arginine. Elle est régulée majoritairement par la voie Rhl du « quorum-sensing » et est sous contrôle minoritaire mais indispensable de la voie Las (Kholer *et al.*, 2000).

A faible concentration, les rhamnolipides sont capables de provoquer le relargage de quelques lipopolysaccharides de la membrane externe de la bactérie. Cette libération augmente l'hydrophobicité de la surface de la bactérie favorisant son adhésion à une surface (Herman *et al.*, 1997). Les rhamnolipides jouent un rôle primordial dans la formation et le maintien de la structure du biofilm de *P. aeruginosa* (tableau 12) : après 6 jours de culture en conditions semi-dynamiques, un mutant de la souche de référence PAO1, incapable de produire des

rhamnolipides, développe un biofilm présentant une structure indifférenciée sous forme d'une épaisse couche de cellules massées dépourvue de canaux, à l'inverse de la souche PAO1 qui dans les mêmes conditions de culture développe un biofilm différencié hautement structuré (Davey *et al.*, 2003).

Les propriétés surfactantes des rhamnolipides leur permettent d'interrompre les interactions entre cellules et/ou entre cellule et surface évitant ainsi la colonisation des canaux par des cellules microbiennes ou par la biomasse constitutive du biofilm ce qui permet le maintien de leur ouverture (Davey *et al.*, 2003). De plus, les rhamnolipides participent à la formation des structures dites « champignons » caractéristiques d'un biofilm mature : un mutant incapable de produire des rhamnolipides conserve sa faculté à former la tête de la structure mais cette formation est en moyenne deux fois moins haute que celle correspondant à un biofilm de souche non mutante développé dans des conditions identiques. Bien que les rhamnolipides ne soient pas indispensables à la formation de microcolonies « matures », ils favorisent significativement leur formation en facilitant la migration par « twitching » des cellules mobiles constitutives de la tête des structures « champignons » (Lequette et Greenberg, 2005 ; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). La synthèse des rhamnolipides est ainsi plus spécifiquement induite durant les phases de maturation du biofilm. Elle a lieu dans les microcolonies et est plus particulièrement localisée dans les piliers des structures « champignons » formées au cours de la maturation (Lequette et Greenberg, 2005).

Outre les constituants du biofilm, des éléments provenant de l'environnement extérieur sont susceptibles de contribuer à la formation, au développement et au maintien de la structure du biofilm. Les cations contenus dans l'eau circulante sont généralement piégés dans la matrice extracellulaire où leur présence peut avoir un impact sur la stabilité, l'architecture et la viscosité de la matrice extracellulaire. Les charges négatives portées par les exopolysaccharides et l'ADNe sont particulièrement susceptibles d'induire des interactions électrostatiques avec ces cations (van der Waal et van der Sluis, 2012). Des effets stabilisateurs de la matrice extracellulaire du biofilm de *P. aeruginosa* ont ainsi été attribués au fer, au calcium et au magnésium (Banin *et al.*, 2005). Les concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} accumulés dans le biofilm de *P. aeruginosa* peuvent atteindre respectivement près de 0,1 mg/L et 2,4 mg/L (Kannan et Gautam, 2015). Le rôle de stabilisateur de Ca^{2+} provient notamment de sa capacité à créer des liaisons fortes en se liant sélectivement à certaines séquences de monomères (van der Waal et van der Sluis, 2012).

Tableau 12 : Récapitulatif des principaux éléments constitutifs du biofilm de *P. aeruginosa* et de leur fonction et leur distribution au sein du biofilm.

Composé		Fonction	Distribution	Référence
Exopolysaccharides	Alginate	Chez les souches mucoïdes : Adhésion aux surfaces et structuration et maintien de la MEC	- A la surface des cellules	Ryder <i>et al.</i> , 2007 ; Ghafoor <i>et al.</i> , 2011
	Psl	- Adhésion aux surfaces - Structuration et maintient par augmentation de la réticulation et de l'élasticité de la MEC	- Sous forme hélicoïdale à la surface des cellules - Localisé en périphérie des macrocolonies au cours de la maturation	Jackson <i>et al.</i> , 2004, Ma <i>et al.</i> , 2009 ; Zhao <i>et al.</i> , 2013 ; Wang <i>et al.</i> , 2013 ; Chew <i>et al.</i> , 2014
	Pel	- Formation de biofilm à l'interface air/liquide - Maturation - Augmentation de la densité de la MEC par augmentation de la viscosité et diminution de la réticulation - Résistance aux antibiotiques	ni	Colvin <i>et al.</i> , 2011 ; Ghafoor <i>et al.</i> , 2011 ; Cooley <i>et al.</i> , 2013 ; Wang <i>et al.</i> , 2013
ADN extracellulaire		- Adhésion et agrégation - Stabilisation de la matrice - Favorise la dispersion - Résistance aux antibiotiques	- Au cours des premières étapes de formation : sur la surface d'adhésion et à la surface et l'intérieur des microcolonies - Au cours de la maturation : sur la surface d'adhésion et à la frontière entre tête et pilier des structures « champignons »	Allesen-Holm <i>et al.</i> , 2006 ; Das <i>et al.</i> , 2010 ; Colvin <i>et al.</i> , 2011 ; Peterson <i>et al.</i> , 2013 ; Chiang <i>et al.</i> , 2013 ; Das <i>et al.</i> , 2015
Protéines		- Métabolisme (acquisition de nutriments) - Agrégation - Adhésion aux surfaces - Stabilisation de la matrice - Résistance - Virulence	- Zone de synthèse = zone de diffusion de l'oxygène - Adhésines fimbriale : portées par les organelles dédiées à la mobilité (flagelle et pili) - Adhésines non-fimbriale : sécrétées dans la matrice extracellulaire	Xu <i>et al.</i> , 1998 ; Werner <i>et al.</i> , 2004 ; Soto et Hultgren, 1999 ; Gerlach et Hensel, 2007 ; Borlee <i>et al.</i> , 2010 ; Tielen <i>et al.</i> , 2010
Rhamnolipides		- Formation des microcolonies - Maintien de la structure de la MEC - Facilite la dispersion	- au cours de la maturation : microcolonies et piliers des structures « champignons »	Davey <i>et al.</i> , 2003 ; Lequette et Greenberg, 2005 ; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007

MEC : Matrice Extra-Cellulaire., ni : non indiqué.

Certains facteurs extérieurs peuvent également agir comme des signaux environnementaux et influencer le métabolisme de la bactérie. Ces modifications lui permettent de s'adapter aux changements de son environnement, une adaptation rapide étant indispensable à sa survie.

4. Influence de l'environnement du réseau de distribution d'eau sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa a la capacité de s'implanter sous forme de biofilm dans de nombreux environnements qu'ils soient naturels ou anthropisés ou même qu'il s'agisse d'hôtes humains, animaux ou végétaux. Ces environnements présentent des conditions de développement très différentes susceptibles d'influencer les capacités de formation du biofilm par *P. aeruginosa* et les caractéristiques de ce dernier. Dans le tractus respiratoire humain, caractérisé par des concentrations limitées en oxygène, *P. aeruginosa* développe un biofilm majoritairement composé d'alginate. Dans les réseaux de distribution d'eau, la circulation de l'eau, les sources de nutriments disponibles, les matériaux et la conception des éléments de robinetterie sont susceptibles de favoriser la formation de biofilm par *P. aeruginosa*. Ces effets témoignent de la capacité d'adaptation de la bactérie aux changements environnementaux. Cette adaptation repose sur la présence de systèmes de détection portés sur la surface de la cellule bactérienne. L'induction de ces systèmes par certains signaux environnementaux spécifiques conduit à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'éléments constitutifs du biofilm.

4.1 Principaux systèmes de détection et de transduction du signal en réponse aux changements environnementaux.

Chez *P. aeruginosa*, le passage de l'état mobile à l'état adhérent en réponse aux changements environnementaux est principalement assuré par trois systèmes de détection et de transduction du signal : les systèmes à deux composantes, la diguanylate monophosphate cyclique (c-di-GMP) et les petits ARNs non codants.

Les systèmes à deux composantes (TCS pour Two-Component System) sont constitués d'un couple de molécules : une histidine kinase et un régulateur de réponse. L'histidine kinase joue le rôle de senseur : la détection d'un stimulus environnemental va induire une phosphorylation en cascade qui va conduire à l'activation du régulateur de réponse. Une fois phosphorylé, ce dernier se lie à son ou ses gènes cibles régulant ainsi leur expression. Cette activation est ATP dépendante (Casino *et al.*, 2010). L'ensemble des stimuli susceptibles

d'activer les TCS ne sont pas encore bien identifiés mais pourraient concerner les changements liés aux concentrations en nutriments disponibles, au pH, à la température, à l'osmolarité, à la concentration en magnésium ou à la présence de substances toxiques (Beier et Gross, 2006 ; Mikkelsen *et al.*, 2011). Le génome de PAO1 code pour 127 éléments constitutifs des TCS (Mikkelsen *et al.*, 2011) dont certains jouent un rôle primordial dans le passage de la bactérie de l'état mobile à l'état sessile en régulant l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des pili de la voie « chaperone-uscher », des pili de type IV, des petits ARNs et des exopolysaccharides (tableau 13). Petrova et Sauer (2009) ont mis en évidence, à l'aide d'analyses protéomiques, l'existence de trois TCS spécifiques à certaines étapes de développement du biofilm. Ces TCS sont plus particulièrement impliqués dans la transition d'une étape de développement à l'autre : BfiS/R (Biofilm initiation) assure le passage de l'adhésion réversible à l'adhésion irréversible, BfmS/R (Biofilm maturation) le passage de l'adhésion irréversible à la première étape de maturation et MifS/R (Formation des microcolonies) le passage aux étapes ultérieures à la maturation I. L'inactivation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de ces TCS empêche le passage d'une étape à l'autre mais n'affecte pas la croissance planctonique, la mobilité, la production de Psl ou de Pel ou l'étape d'adhésion initiale (Petrova et Sauer, 2009).

La diguanylate monophosphate cyclique (c-di-GMP) est une petite molécule intracellulaire diffusible agissant comme messenger secondaire. Elle intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires majeurs (tableau 13) tels que la mobilité, la virulence, le passage de l'état planctonique à l'état adhérent, la production d'exopolysaccharides, l'auto-aggregation, l'adhésion et la dispersion (Krasteva *et al.*, 2012 ; Martinez et Vadyvaloo, 2014). La concentration intracellulaire de la c-di-GMP est modulée par un couple d'enzymes, une diguanylate cyclase (DGC) et une phosphodiesterase (PDE), impliqué dans sa synthèse et sa dégradation (Mills *et al.*, 2011). Ces enzymes entrent en activité en réponse aux conditions environnementales et à leurs changements. Selon ces changements, la DGC ou la PDE est activée, conduisant respectivement à la synthèse ou la dégradation de la c-di-GMP. La DGC et la PDE sont porteuses de domaines senseurs impliqués dans leur réceptivité aux changements relatifs, entre autres, aux potentiels redox, à l'oxygène, à l'osmolarité, aux nutriments ou aux antibiotiques. Ces domaines senseurs leur permettent d'adapter le niveau intracellulaire de la c-di-GMP en réponse à ces modifications (Mills *et al.*, 2011).

Tableau 13 : Quelques exemples des principaux systèmes permettant la transition du passage de l'état mobile à l'état adhérent chez *P. aeruginosa* en fonction des facteurs environnementaux.

Système	Nom	Signal environnemental	Exemples de processus régulé	Références
Système à deux composantes	Roc1	?	Synthèse des pili de la voie CU	Mikkelsen <i>et al.</i> , 2011 Giraud <i>et al.</i> , 2011
	Roc2	?		
	Rcs/Pvr	?		
	PprA/PprB	Oxygène et absence de force de cisaillement*	Synthèse des pili de type IV	Mikkelsen <i>et al.</i> , 2011 Giraud <i>et al.</i> , 2011
	PilR/PilS	?		
	PprA/PprB	Oxygène et absence de force de cisaillement*		
	FimS/AlgR	?	Synthèse de l'alginate	Mikkelsen <i>et al.</i> , 2011
	KinB/AlgB	?		
	RetS	Molécule ayant une structure similaire au carbohydrates*	Synthèse des exopolysaccharides Psl et Pel	Mikkelsen <i>et al.</i> , 2011
	LadS			
	GacS/GacA	?	Synthèse de c-di-GMP	Guvener et Harwood, 2007
	WspE/WspR	Adhésion à une surface		
	CbrA/CbrB	Nature des sources de carbone	Synthèse du petit ARN crz Mobilité de type swarming Formation de biofilm Cytotoxicité	Sonnleitner <i>et al.</i> , 2012B
	PhoR/PhoB	Concentration en phosphate	Résistance aux antibiotiques Synthèse de rhlr	
c-diGMP	NarX/NarL	Concentration en nitrate	Mobilité de type swimming Mobilité de type swarming Synthèse de rhamnolipide	Van Alst <i>et al.</i> , 2007
	BfiS/BfiR (Biofilm initiation)	?	Initiation du biofilm	Petrova et Sauer, 2009
	MifS/MifR (Microcolonies formation)	?	Formation de microcolonies	Petrova et Sauer, 2009
	BfmS/BfmR (Biofilm maturation)	?	Maturation du biofilm	Petrova et Sauer, 2009
	SiaD	Exposition à un détergent	Synthèse de l'exopolysaccharide Pel Synthèse de la protéine CupA	Klebensberger <i>et al.</i> , 2009
	SadC	Contact avec une surface ou Changement de viscosité du milieu*	Contrôle du sens de rotation du flagelle	Merritt <i>et al.</i> , 2007
	RoeA	?	Synthèse de l'exopolysaccharide Pel	Merritt <i>et al.</i> , 2010
	YfiN = TpbB (Tyrosine phosphate related to biofilm)	?	Synthèse des exopolysaccharides Psl et Pel	Malone <i>et al.</i> , 2010
Petits ARNs non-codants	RsmZ et RsmY	?	Synthèse de facteurs de virulence Synthèse des pili de type iv Synthèse d'éléments du Système de sécrétion de type ii	Sonnleitner <i>et al.</i> , 2012A
	PrrF1 et PrrF2	Concentration en fer	Capture et stockage du fer Protection contre le stress oxydatif	
	PhrS	Concentration en oxygène	Synthèse de pyocyanine	Sonnleitner <i>et al.</i> , 2012A
	CrcZ	Sources de carbone	Synthèse d'éléments nécessaires à la communication cellulaire	
			Synthèse d'enzymes cataboliques	Sonnleitner <i>et al.</i> , 2012A

? : signal environnemental inconnu, * : hypothèse

Les petits ARNs sont des ARN non-codants composés de 50 à 300 nucléotides et caractérisés par leur activité régulatrice (Storz *et al.*, 2011). Cette dernière s'exerce par reconnaissance de séquences spécifiques aux ARNm ou aux protéines cibles et liaison des petites ARNs à celles-ci par complémentarité. Grâce à leur activité régulatrice, les petits ARN participent à la régulation d'un panel de mécanismes bactériens (tableau 13) incluant le métabolisme du carbone (Repoila et Darfeuille, 2009), la concentration intracellulaire de c-di-GMP, la production d'exopolymères (Chambers et Sauer, 2013), le maintien de la concentration intracellulaire en fer (Repoila et Darfeuille, 2009), la production de fimbriae, la virulence, la communication intercellulaire, la réponse à différent stress relevant de l'oxydation, de la perturbation de la membrane ou de l'accumulation de phosphate (Chambers et Sauer, 2013) et la formation de biofilm (Richards et Vanderpool, 2011). Sur la quarantaine de séquences identifiées comme codant potentiellement pour des petits ARNs chez *P. aeruginosa*, moins d'une dizaine a pu être caractérisée (Livny *et al.*, 2006 ; Sonnleitner *et al.*, 2012A et B).

4.1 Facteurs environnementaux influençant la formation de biofilm.

4.1.1 Concentration en nutriments disponibles.

Un des facteurs clé régulant la croissance bactérienne dans les réseaux d'eau est la concentration en nutriments disponibles (Chandy et Angles, 2001). Le métabolisme des bactéries hétérotrophes nécessite un approvisionnement en carbone (C), en azote (N) et en phosphore (P) avec un ratio de 100:10:1 (LeChevallier *et al.*, 1991).

4.1.1.1 Le carbone.

Dans la plupart des écosystèmes aquatiques le carbone est considéré comme le facteur nutritif limitant (Vital *et al.*, 2010). Les eaux souterraines, les eaux de surface et l'eau potable contiennent des concentrations en carbone organique assimilable par les microorganismes généralement comprises entre 10 et 100 µg/L (Egli, 2010). Ces concentrations sont susceptibles de suffire au métabolisme de *P. aeruginosa*. Vital *et al.* (2010) ont en effet montré que *P. aeruginosa* a la capacité de croître à des concentrations en carbone organique assimilable comprises entre 37 à 5 500 µg/L. La capacité de *P. aeruginosa* à cataboliser de multiples sources de carbone contribue à diminuer ce seuil et lui assure de plus grandes chances de survie dans des milieux pauvres en nutriments (Egli, 2010).

La concentration de ces sources de carbone influence fortement les capacités de *P. aeruginosa* à former du biofilm (tableau 14). Le stress nutritionnel lié à la limitation des concentrations en carbone disponible conduit à la dispersion du biofilm. Cette dispersion a pu être observée par développement de biofilms de PAO1 de 4 jours en milieu minimum

supplémenté en glucose (10 mM) et en conditions semi-dynamiques. L'observation en microscopie confocale montre que la dispersion commence 5 minutes après l'arrêt de l'approvisionnement en glucose et est maximale après 2 h d'arrêt. Après 24 h d'arrêt, plus de 60 % de la biomasse initiale est dispersée et la densité du biofilm est réduite d'environ 44 % (Huyn *et al.*, 2012). Pour un développement en milieu minimum supplémenté en glucose (0,56 mM), l'épaisseur moyenne du biofilm, initialement de 300 μ m, est divisée par 10 trois jours après l'arrêt de l'approvisionnement en glucose avec un détachement de plus de 90 % des cellules initialement adhérentes (Hunt *et al.*, 2004). L'étude du protéome de ces biofilms montre que la synthèse de plus d'une centaine de protéines impliquées dans le métabolisme du carbone et de l'énergie, dans la mobilité et dans l'adaptation au stress, est modifiée (Huyn *et al.*, 2012). La dispersion du biofilm de *P. aeruginosa* est également provoquée par un apport nutritionnel soudain. La multiplication par un facteur dix de la concentration des sources de carbone auxquelles sont exposés des biofilms de *P. aeruginosa* de 4 jours provoquent leur dispersion. L'effet est dépendant de la nature de la source de carbone : à concentration identique (20 mM) le succinate présente un effet plus important que le glucose (Sauer *et al.*, 2004). Cette dispersion est associée à l'augmentation de l'expression des gènes codant pour la synthèse du flagelle et à la diminution de l'expression des gènes codant pour la synthèse des pili. La dispersion est suggérée comme étant dépendante de l'importance de la différence de concentration : plus celle-ci est grande plus la dispersion est importante (Sauer *et al.*, 2004).

La nature des sources de carbone disponibles joue un rôle important sur la structuration du biofilm (tableau 14). Des souches de PAO1 développant un biofilm en conditions semi-dynamiques forment un biofilm différencié, hétérogène, avec des structures dites « champignons », lorsque la seule source de carbone disponible est du glucose. Dans des conditions de cultures identiques, ces mêmes souches forment un biofilm indifférencié, plat et uniforme, lorsque la seule source de carbone est du succinate, du glutamate, du citrate, du benzoate ou des acides casamines (Klausen *et al.*, 2003 ; Shrout *et al.*, 2006). L'effet du citrate sur le biofilm se traduit par l'émergence d'un modèle alternatif de développement. Dans ce modèle, le flagelle ne joue pas de rôle dans l'attachement initial, la formation des microcolonies provient de la croissance clonale et la mobilité de type « twitching » assure l'expansion du biofilm tout en limitant la largeur des microcolonies (Klausen *et al.*, 2003). L'effet du succinate sur la structure du biofilm est lié quant à lui (i) à l'augmentation de la mobilité de type « swarming » résultant de l'augmentation de la synthèse d'un précurseur des rhamnolipides agissant comme un surfactant (Shrout *et al.*, 2006) et (ii) à sa capacité à chélater le fer, élément indispensable à la formation de biofilm par *P. aeruginosa* (Harmsen *et al.*, 2010).

L'influence de la nature et de la concentration des sources de carbone sur le biofilm de *P. aeruginosa* a été estimée pour des concentrations de l'ordre du milligramme par litre ou du gramme par litre. La concentration de ces éléments dans les eaux souterraines, les eaux de surface et l'eau potable étant de l'ordre du microgramme par litre (Egli, 2010), il est difficile d'estimer leur impact dans des conditions de développement relevant de celles retrouvées dans les réseaux de distribution d'eau minérale naturelle.

4.1.1.2 L'azote.

Différentes formes chimiques de l'azote peuvent influencer le développement de biofilm (tableau 14). C'est notamment le cas de l'oxyde nitrique (NO), radical libre soluble dans l'eau, généré par la réduction de nitrates provenant de l'environnement. Le NO est plus particulièrement utilisé par la bactérie en conditions anaérobies comme accepteur d'électron alternatif à l'oxygène (Arai, 2011). Cependant, en conditions aérobies, l'exposition de biofilms de *P. aeruginosa* à des concentrations sublétales de NO (25 à 500 nM) favorise leur dispersion (Barraud *et al.*, 2006). Cette dispersion résulte de l'implication du NO dans l'inhibition de l'expression des gènes codant pour des éléments impliqués dans l'adhésion de la bactérie (Firoved *et al.*, 2004), l'augmentation des capacités de mobilité de types « swimming » et « swarming » (Barraud *et al.*, 2006 ; Van Alst *et al.*, 2007) et l'augmentation de la synthèse de PDE, enzyme responsable de la dégradation de la ci-di-GMP régulant l'expression d'éléments impliqués dans la formation de biofilm (Barraud *et al.*, 2009). A des concentrations de l'ordre du micromolaire, NO a la capacité de favoriser l'expression des gènes sous régulation du fer en inactivant le régulateur de transcription Fur (Firoved *et al.*, 2004).

Certains acides aminés lorsqu'ils sont apportés à la bactérie comme seule et unique source d'azote influence la mobilité de type « swarming », la production de rhamnolipides et la formation de biofilm par *P. aeruginosa* (Kholer *et al.*, 2000 ; Bernier *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2015). Bien que tous les acides aminés aient tendance à favoriser la formation de biofilm, seule une dizaine d'entre eux a un effet significatif (Bernier *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2015).

Les concentrations en acides aminés sont de l'ordre de quelques microgrammes par litre dans les eaux souterraines, les eaux de surface ou l'eau potable (Egli, 2010).

4.1.1.3 Le phosphore.

Certaines études ont montré que le phosphore pouvait être un facteur nutritif limitant la formation de biofilm par les communautés microbiennes autochtones de l'eau potable (Miettinen *et al.*, 1997 ; Chandy et Angles, 2001 ; Polanska *et al.*, 2005). Cet effet est plus particulièrement observable dans des conditions où les concentrations en carbone organique

assimilable ne sont pas limitantes (Park et Hu, 2010). Une concentration de 1 μg de P-PO_4 supporte la croissance de $3,2 \cdot 10^8$ ufc de *Pseudomonas fluorescens* (Polanska *et al.*, 2005). L'étude de l'effet des concentrations en carbone organique assimilable et en phosphore sur le développement de biofilm par la flore autochtone d'eau potable montre que chacun de ces éléments a un effet positif individuel sur la formation de biofilm, bien que le phosphore présente un effet 4,4 fois moins fort que celui du carbone. Un effet synergique entre ces deux éléments a également été mis en évidence sur la formation de ces biofilms, de même qu'une accumulation du phosphate par les exopolymères constitutifs de leur membrane extracellulaire (Park et Hu, 2010). L'étude de l'influence du phosphore sur le biofilm de *P. aeruginosa* est peu rapportée dans la littérature. Xu *et al.* (2015) montrent que la formation de biofilm par cette bactérie est favorisée pour des concentrations en phosphate comprises entre 3 et 8 μM et décroît pour une concentration de 35 μM (tableau 14).

4.1.1.4 Le fer.

Le fer est un élément indispensable au métabolisme bactérien. Son rôle de donneur/accepteur d'électrons lui permet de soutenir le fonctionnement de la chaîne respiratoire en conditions aérobies ou anaérobies. Ce métal agit également comme cofacteur de réactions enzymatiques et est le composant majeur de certaines protéines. Les besoins en fer des bactéries sont de l'ordre de 10^5 ions Fe^{2+} par cellule (Braun, 2001).

Les concentrations en fer disponibles influencent fortement le développement de biofilm de *P. aeruginosa* (figure 9 et tableau 14). De très faibles concentrations en fer défavorisent la formation de biofilm. Singh *et al.* (2002) montrent que la chélation du fer par la transferrine diminue les capacités de *P. aeruginosa* à développer du biofilm en conditions semi-dynamiques. Cette diminution est associée à une augmentation de la mobilité de type « twitching » et à une diminution de la résistance aux antibiotiques (Singh *et al.*, 2002). L'augmentation de la mobilité est confirmée pour des concentrations en fer inférieures à 4 μM (Patriquin *et al.*, 2008) et est associée à une production précoce de rhamnolipides (Glick *et al.*, 2010). A l'inverse, des concentrations limitées en fer favorisent le développement de biofilm par *P. aeruginosa*. Berlutti *et al.* (2005) montrent que la présence de fer à une concentration de 10 μM stimulent la formation d'agrégats en suspension par la souche de référence PAO1. Yang *et al.* (2007) montrent que pour des concentrations en fer de 5 et 10 μM la formation de biofilm par PAO1 est corrélée à une forte libération d'ADNe et une forte expression des gènes codant pour la voie du « quorum-sensing » de type PQS. Cet effet tend à disparaître pour des concentrations en fer de 50 μM et de 100 μM suggérant que des concentrations en fer plus

élevées défavorisent la formation de biofilm. Patriquin *et al.* (2008) montrent ainsi que la formation de biofilm par *P. aeruginosa* tend à être défavorisée pour des concentrations en fer comprises entre 32 et 64 μM . Un biofilm de PAO1 développé dans un milieu contenant 100 μM de fer présente une structure moins complexe qu'un biofilm développé en conditions limitées en fer (Yang *et al.*, 2007).

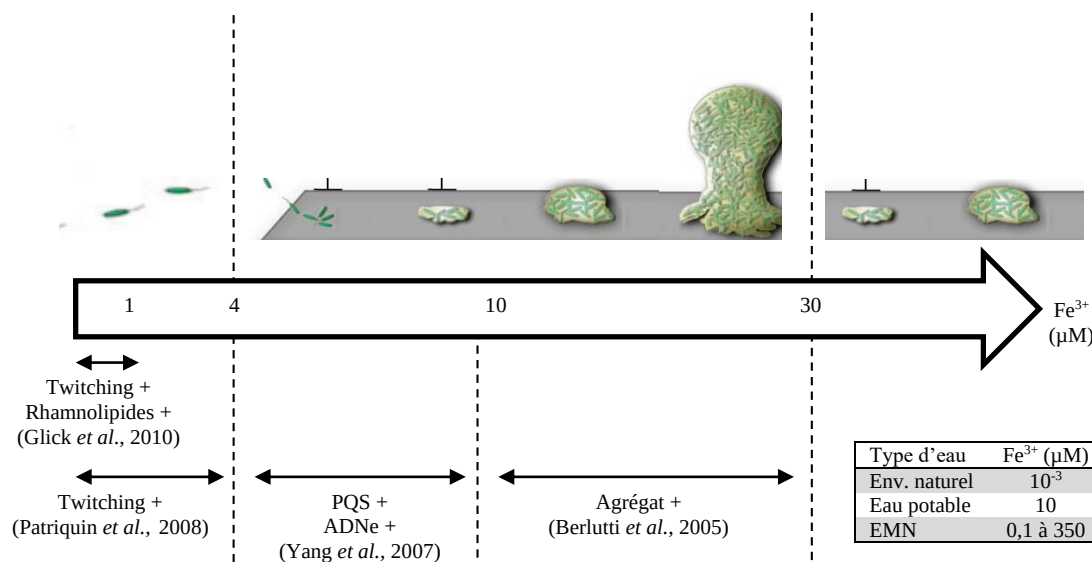


Figure 9 : Influence de la concentration en fer sur la formation de biofilm par la souche de référence PAO1 et exemples de concentration en fer de différents types d'eau (env. : environnement ; EMN : Eaux Minérales Naturelles).

Dans l'environnement, en conditions aérobies et à pH neutre, le fer est principalement présent sous sa forme insoluble Fe^{3+} qui n'est pas directement utilisable par les bactéries. Dans les milieux hydriques naturels, Fe^{3+} est retrouvé à des concentrations de 10⁻³ μM (Braun, 2001) et de l'ordre de 10 μM en eau potable (Diduch *et al.*, 2011). La concentration du fer dans les eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques est variable : elle peut être comprise entre 0,1 μM à plus de 350 μM dans le cas des eaux dites ferrugineuses (Popoff, 2010). Ces concentrations sont à même de supporter la croissance bactérienne, cette dernière nécessitant des concentrations en Fe^{3+} de l'ordre de 10⁻¹ à 1 μM (Vasil et Ochsner, 1999 ; Braun, 2001), et le développement de biofilm, celui-ci nécessitant des concentrations en fer de l'ordre de 10 μM .

4.1.2 Hydrodynamique.

Dans les réseaux de distribution d'eau, un biofilm est exposé à des forces hydrodynamiques caractérisées par les notions de contraintes de cisaillement et d'écoulements.

Les contraintes de cisaillement incluent les principales forces d'écoulements susceptibles d'être rencontrées par un microorganisme. Deux types d'écoulements sont

principalement distingués : les écoulements laminaires et les écoulements turbulents. La nature de ces écoulements est caractérisée par leur vitesse (v) et par le nombre de Reynolds (Re). L'écoulement est considéré comme laminaire pour des valeurs de Re inférieures à 2 000 et comme turbulent pour des valeurs supérieures à 2 000. Les forces d'écoulements sont considérées comme nulles à proximité directe de la surface, plus la distance à la surface augmente plus ces forces sont importantes. Un microorganisme adhérent à une surface est donc exposé à des forces d'écoulements plus fortes à son sommet qu'à sa base. Les forces de cisaillement s'exercent parallèlement à une surface et dépendent de la viscosité du milieu et des dimensions du microorganisme considéré (Busscher et van der Mei, 2006). L'exposition de biofilms bactériens aux forces de cisaillement conduit à un accroissement de leur densité et de leur cohésion. Cet accroissement est lié à une augmentation de la proportion de cellules présentant une forte hydrophobicité de surface, et donc de plus fortes capacités d'autoaggrégation (Rickard *et al.*, 2004), et à une déformation latérale de la matrice extracellulaire pouvant réduire sa porosité (Mathieu *et al.*, 2014). Lecuyer *et al.* (2011) montrent que l'exposition de la souche *P. aeruginosa* PA14 à des contraintes de cisaillement conduit à une augmentation des forces d'adhésion des cellules fixées sur la surface testée. Ce décuplement des forces d'adhésion résulte de l'augmentation du temps de contact entre bactérie et surface.

Dans le cas d'une surface idéale, homogène et lisse, les forces d'adhésion d'un microorganisme s'appliquent perpendiculairement à la surface, et en s'ajoutant aux forces de cisaillement, provoquent un déplacement latéral de la bactérie sur la surface. Dans des conditions plus hétérogènes, le déplacement est susceptible de conduire à un décrochage du microorganisme (Busscher et van Der Mei, 2006). Stoodley *et al.* (2001) montrent que l'exposition d'un biofilm de 24 jours développé par quatre souches bactériennes, dont la souche *P. aeruginosa* ATCC 700829, à un écoulement turbulent ($v=1$ m/s et $Re=3\,600$) conduit au décrochage de regroupements de cellules dont le plus large présente un diamètre de 500 μm . Un biofilm couvrant une surface d'1 cm^2 est susceptible de libérer cinq regroupements de ce type par heure ce qui conduit à la libération de $3,6 \cdot 10^9$ ufc/min.

Les écoulements turbulents et laminaires influencent également la structure et la morphologie du biofilm de *P. aeruginosa* (tableau 14). Le développement du biofilm de la souche de référence PAO1 en conditions d'écoulements laminaires ($v=0,033$ m/s, $Re=100$) conduit à la formation d'une structure composée d'une fine couche de cellules comprenant des macrocolonies circulaires. A sa surface, peuvent se former, perpendiculairement à la direction de l'écoulement, des ondulations régulièrement espacées. Le développement de ce même

biofilm en conditions d'écoulements turbulents ($v=1$ m/s, $Re=3\,000$) conduit à l'établissement d'une structure prenant la forme de regroupements de cellules essaimés sur la surface ou confluant en une monocouche surplombée de filaments de biofilm flottant dans le milieu et à la surface de laquelle peuvent se former des ondulations. Les ondulations formées dans les deux conditions d'écoulements ont les mêmes dimensions mais leur propagation à la surface des biofilms est plus de dix fois plus rapide en écoulement turbulent (Purevdorj *et al.*, 2002). Kirisits *et al.* (2007) ont montré qu'à un régime d'écoulements élevés, correspondant à des conditions d'écoulements turbulents ($v=380$ m/s, $Re=3\,000$), le système de communication cellulaire relevant du « quorum-sensing » n'est pas pleinement opérationnel et ne joue pas un rôle significatif dans la formation et le développement de biofilm pouvant expliquer les différences structurelles et morphologiques observées entre les deux conditions d'écoulements.

Dans les réseaux de distribution d'eau potable, la vitesse d'alimentation en eau doit être inférieure ou égale à 2 m/s pour les canalisations en sous-sol, les vides sanitaires, les locaux techniques et les branchements d'étages et appareils pour un débit supérieur à 0,5 L/s et doit être inférieure ou égale à 1,5 m/s pour les colonnes montantes (DTU 60.11 P 1-1, 2013). Dans les réseaux d'eau chaude sanitaire, une vitesse minimale de 0,2 m/s a été imposée dans les retours de boucles de façon à limiter le développement de biofilm et l'accumulation de dépôts (DTU 60.11 P 1-2, 2013). Dans les réseaux de distribution d'eau minérale naturelle, des vitesses de circulation d'eau de 1 m/s ou 2 m/s sont utilisées comme procédés mécaniques de nettoyage, respectivement à l'eau et à l'air et à l'eau seule (DGS, 2000). Les écoulements rencontrés dans les réseaux de distribution d'eau sont donc majoritairement de type turbulent.

Tableau 14 : Facteurs environnementaux influençant la formation de biofilm par *P. aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eaux minérales naturelles.

Facteur environnemental	Forme chimique ou physique	Ordre de concentrations dans les réseaux de distribution d'EMN	Ordre de concentrations testées	Influence sur le biofilm	Référence
carbone	carbone organique assimilable	10 à 100 µg/L	µg/L	suffisant au métabolisme de la bactérie	Vital <i>et al.</i> , 2010
	source de carbone spécifique	µg/L	du mg/L au g/L	stress nutritif ou apport soudain en nutriments : défavorise la formation de biofilm en concentration limitées : favorise la formation de biofilm différence de structure selon la source de carbone disponible	Hunt <i>et al.</i> , 2004 ; Huyn <i>et al.</i> , 2012 ; Sauer <i>et al.</i> , 2004
azote	nitrate/NO acides aminés	mg/L	µg/L	25 à 500 nM : favorise la dispersion	Barraud <i>et al.</i> , 2006
		µg/L	g/L	favorise la formation de biofilm	Bernier <i>et al.</i> , 2011 ; Xu <i>et al.</i> , 2015
phosphore	phosphate	µg/L	du mg/L au g/L	favorise la formation de biofilm en concentration limitée	Xu <i>et al.</i> , 2015
fer	Fe ³⁺	µg/L	µg/L	[Fe ³⁺] < 4 µM : défavorise la formation de biofilm 4 µM < [Fe ³⁺] > 30 µM : favorise la formation de biofilm [Fe ³⁺] > 30 µM : défavorise la formation de biofilm	Patriquin <i>et al.</i> , 2008 ; Yang <i>et al.</i> , 2007 ; Glick <i>et al.</i> , 2010
hydrodynamique	contraintes de cisaillement	-	10 ⁻² à 10 Pa	augmentation des forces d'adhésion et de la densité du biofilm, diminution de la porosité de la matrice extracellulaire	Lecuyer <i>et al.</i> , 2011
	écoulement laminaire	-	≤ 0,033 m/s (Re ≤ 100)	influence sur la structure : fine couche de cellules comprenant des macrocolonies circulaires et ondulations régulièrement espacées pouvant se former perpendiculairement à la direction de l'écoulement.	Purevdorj <i>et al.</i> , 2002
	écoulement turbulent	1 m/s à 2 m/s (nettoyage)	1 m/s (Re = 3000)	influence sur la structure : clusters de cellules essaimés sur la surface ou confluent en une monocouche surplombée de filaments et à la surface de laquelle peuvent se former des ondulations	Purevdorj <i>et al.</i> , 2002

4.1.3 Matériaux constitutifs du réseau de distribution d'eau.

De nombreuses études décrivent l'influence de la nature des matériaux sur la formation et le développement de biofilms bactériens (tableau 15). Simoes *et al.* (2007) montrent que l'adhésion de sept espèces bactériennes, prises séparément et choisies comme représentatives de la flore autochtone de l'eau potable, est généralement plus importante sur le polyéthylène (PE) que sur le polychlorure de vinyle (PVC) ou l'acier inoxydable (inox) 316. Yu *et al.* (2010) classent différents matériaux selon leur aptitude à promouvoir la formation de biofilms de 90 jours par la flore autochtone d'eau potable dans l'ordre suivant : cuivre < Polychlorure de Vinyle surchloré (PVC-C) < Polyéthylène (PE) < Inox < Polybutylène. Il est ainsi couramment admis que la majorité des matériaux organiques favorise la formation de biofilm par comparaison aux matériaux métalliques. Cette différence peut notamment s'expliquer par la divergence de leurs propriétés de surface. La majorité des matériaux métalliques est notamment caractérisée par une forte énergie de surface associée à une charge de surface fortement négative (An et Friedman, 1998). Ces dernières sont à l'origine de la création d'une barrière énergétique et de l'induction de forces de répulsion qui contribuent à défavoriser l'adhésion bactérienne. A l'inverse les matériaux organiques sont principalement caractérisés par une faible énergie de surface et une charge de surface négative plus faible (An et Friedman, 1998) qui tendent à favoriser l'adhésion bactérienne. A titre d'exemple, la charge de surface globale d'un inox 316 a été estimée à -333 ± 9 mV à pH 7 (Kumar et Ting, 2013) tandis que celle d'un PVC a été évaluée à $-42,7 \pm 5,8$ mV à pH 7,2 (Triandafillu *et al.*, 2003). Les matériaux organiques peuvent de plus libérer des molécules biodégradables de faibles poids moléculaire susceptibles d'être une source de nutriments pour les microorganismes. Ces molécules proviennent des additifs utilisés dans les processus de fabrication des matériaux organiques (Moritz *et al.*, 2010). L'état de surface des matériaux joue également un rôle dans l'adhésion des cellules bactériennes : globalement plus leur surface est irrégulière plus l'adhésion est favorisée (Whitehead *et al.*, 2005). Les bactéries adhèrent préférentiellement au niveau des irrégularités ayant une taille proche de la leur (Katsikogianni et Missirlis, 2004) et au fond des crevasses plutôt qu'à leur surface (Anselme *et al.*, 2010).

La capacité de *P. aeruginosa* à former du biofilm est également influencée par la nature des matériaux. L'utilisation de techniques de spectrométrie de masse a mis en évidence que le biofilm de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 (isolée d'une hémoculture) développé sur un coupon en PE entraine plus rapidement en phase de maturation que le même biofilm développé sur un coupon en verre (Pereira *et al.*, 2015). Oh *et al.* (2009) montrent que l'adhésion de cette même souche de *P. aeruginosa* est particulièrement favorisée sur le PE et particulièrement

défavorisée sur l'inox. Ces effets sont associés à l'irrégularité de surface de chacun de ces matériaux mesurées par microscopie à force atomique : le PE testé présente une irrégularité de surface plus importante que celle de l'inox (Oh *et al.*, 2009). Moritz *et al.* (2010) montrent que la souche *P. aeruginosa* AdS (isolée d'eau potable) n'a pas la capacité d'intégrer un biofilm d'eau potable de 14 jours, préétabli sur un coupon de cuivre. A l'inverse cette même souche arrive à intégrer et à persister pendant plus de 29 jours dans ce même biofilm développé sur un coupon d'éthylène-propylène-diène monomère (EPDM) ou de polyéthylène réticulé (PE-X c). L'effet inhibiteur du cuivre est attribué à la toxicité de ses ions en solutions (Moritz *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces éléments suggère que la formation de biofilm par *P. aeruginosa* est favorisée par les matériaux organiques plutôt que par les matériaux métalliques. Cependant, l'effet de ces matériaux sur la capacité de *P. aeruginosa* n'a pas été étudié dans les mêmes conditions de développement ni pour une même souche. De la même façon, les études citées ci-dessus ont été réalisées dans un contexte environnemental correspondant à celui de l'eau potable. Les propriétés de surface des matériaux influençant le développement de biofilm sont susceptibles d'être modifiées dans un contexte environnemental propre à celui des eaux minérales naturelles, notamment par adsorption des minéraux à la surface des matériaux.

Tableau 15 : Etudes rapportant l'influence des matériaux sur la capacité de certains microorganismes à produire du biofilm.

Matériaux testés	Composition de l'Inoculum	Techniques d'analyses	Processus concerné	Classification des matériaux selon leur capacité à promouvoir le développement de biofilm	Référence
Acier doux Ethylène PP Inox Latex PE PP PVC-C PVC-u	boues de calorifère contaminées par <i>L. pneumophila</i> suspendue dans de l'eau potable stérilisée par filtration	flore totale : dénombrement sur R2A <i>L. pneumophila</i> : dénombrement sur BCYE	formation de biofilm (28 jours)	flore total : inox < PP < PVC-C < PVC-u < Acier doux < PE < ethylène PP < Latex <i>L. pneumophila</i> : PE < PVC-u < Inox < Acier doux < PP < PVC-C < ethylène PP < Latex	Rogers <i>et al.</i> , 1994A
Cuivre PB PVC-C	boues de calorifère contaminées par <i>L. pneumophila</i> suspendue dans de l'eau potable stérilisée par filtration	flore totale : dénombrement sur R2A <i>L. pneumophila</i> : dénombrement sur BCYE	formation de biofilm (21 jours)	flore totale : à 20 °C : cuivre < PB < PVC-C à 40 °C, 50 °C et 60 °C : cuivre < PVC-C < PB <i>L. pneumophila</i> : à 20 °C : cuivre < PB < PVC-C à 40 °C et à 50 °C : cuivre < PVC-C < PB à 60 °C : absence	Rogers <i>et al.</i> , 1994B
Cuivre PE	eau potable	Dénombrement sur R2A ATP	formation de biofilm (200 jrs)	cuivre < PE	Lehtola <i>et al.</i> , 2004
Cuivre Inox 316 PER	communauté bactérienne dont <i>L. pneumophila</i>	flore totale : dénombrement sur R2A <i>Legionella</i> : dénombrement sur BCYE ATP	formation de biofilm (210 jrs)	flore totale : Cuivre = inox < PER <i>Legionella</i> : cuivre < inox < PER ATP : Cuivre = inox < PER	van der Kooij <i>et al.</i> , 2005
Inox 316 PE PVC PB PE PP PVC	9 espèces bactériennes représentatives de la flore autochtone de l'eau potable	marquage au cristal violet	adhésion (2 h)	inox 316 < PVC < PE	Simoès <i>et al.</i> , 2007
PB PE PP PVC	eau potable	MEB Dénombrement sur R2A	formation de biofilm	PVC = PE < PB < PP	Traczewska et Sitarska, 2009
Cuivre Inox Inox couvert de zinc PB PE PVC-C	eau potable eau potable + eau de rivière eau potable + <i>E. coli</i>	ATP ATP dénombrement sur LB	activité métabolique au sein du biofilm (90 jrs)	cuivre < PVC-C < PE < Inox < PB < inox + zinc cuivre < PVC-C < PB < PE < Inox + zinc < Inox cuivre < PVC-C < PE < PB < Inox < inox + zinc	Yu <i>et al.</i> , 2010

Acier doux : alliage de fer et de carbone, couramment utilisé en construction

PB : polybutylène, PE : polyéthylène, PER : PE réticulé, HDPE : PE haute densité, PP : polypropylène, PVC : polychlorure de vinyle, PVC-C : PVC surchloré, PVC-u : PVC non-plastifié

IV. Conclusion de l'étude bibliographique

La France compte plus d'une centaine d'établissements thermaux qui exploitent des eaux minérales naturelles à des fins thérapeutiques. Ces eaux appartiennent à différentes catégories selon leur composition minérale, et sont notamment regroupées sous les appellations eaux sulfurées, eaux sulfatées, eaux chlorurées sodiques, eaux bicarbonatées gazeuses et eaux faiblement minéralisées. Une attention particulière est accordée à la surveillance de la ressource, tant sur sa vulnérabilité aux pollutions qu'à sa disponibilité. Ces eaux sont acheminées du point d'émergence aux postes de soins par des réseaux de distribution spécifiques dont le régime hydraulique varie de quelques m³/h à plusieurs dizaines de m³/h. Selon la température d'émergence, qui peut varier de 10 à 72 °C, la conception des réseaux varie pour délivrer l'eau à une température adaptée aux soins. La configuration des points d'usage répond aux besoins du mode d'administration de l'eau. La qualité microbiologique de celle-ci répond à des exigences réglementaires strictes. Elle est obtenue par le traitement des réseaux en dehors des plages d'utilisation par les curistes, la présence de résiduel de produit de désinfection dans l'eau thermale étant réglementairement interdite.

Cette étude bibliographique a permis (i) de présenter les caractéristiques propres aux eaux minérales naturelles et à leur exploitation à des fins thérapeutiques en établissements thermaux, (ii) de souligner l'importance des problématiques liées à la présence de *P. aeruginosa* dans les réseaux de distribution, et (iii) de s'intéresser aux différents facteurs susceptibles d'influencer l'implantation de la bactérie sous forme de biofilm.

Deux éléments notables ressortent de cette étude :

- l'influence des conditions environnementales sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa*,
- l'absence de données scientifiques sur le comportement de *P. aeruginosa* dans un environnement au contenu minéral complexe.

Afin d'apporter des éléments de compréhension sur les facteurs qui favorisent l'implantation de *P. aeruginosa* dans les réseaux d'eau et de valider l'efficacité de produits de traitement/désinfection sur des biofilms, nous avons choisi de réaliser les expérimentations sur un modèle de biofilm jeune. Des choix expérimentaux et méthodologiques ont été effectués pour prendre en compte la diversité des souches de *P. aeruginosa*, la variabilité de la

composition minérale des eaux thermales et les différents matériaux constitutifs des réseaux de distribution et des postes de soins.

Les souches de *P. aeruginosa* détectées dans les réseaux d'eau thermale sont susceptibles d'être apportées par l'eau thermale sans avoir été détectées à l'émergence, par l'eau potable utilisée pour rincer les réseaux après l'application des traitements ou par les curistes à la faveur de rétro-contaminations. Les facultés d'adaptation et les capacités à former du biofilm de *P. aeruginosa* peuvent varier d'une souche à l'autre selon leur origine, les stress environnementaux subis et les pressions de sélection rencontrées. Un panel de neuf souches a été constitué. Il comprend la souche de référence PAO1, largement étudiée pour ses capacités à former du biofilm, sept souches d'origine environnementale, isolées d'eau potable ou d'eau thermale, et une souche d'origine clinique.

Pour étudier la capacité des souches choisies à former du biofilm dans des milieux de compositions minérales différentes, nous avons opté pour l'utilisation d'eaux minérales naturelles embouteillées. En effet, au début de notre étude, il ne nous semblait pas possible de prendre en compte de façon exhaustive la variabilité des eaux thermales. De plus, ce choix nous permettait de nous affranchir des difficultés d'approvisionnement et des risques d'altération de la composition de l'eau thermale lors du transport, et de garantir une composition minérale réelle constante au cours des expérimentations. Trois eaux minérales naturelles embouteillées ont été choisies suivant la valeur de leur résidu sec à 180 °C de façon à représenter trois niveaux de minéralisation dits faible (130 mg/L), moyen (309 mg/L) et fort (1084 mg/L).

Le traitement des réseaux de distribution d'eau thermale est assuré par l'application de procédures de nettoyage et de désinfection quotidiennes. C'est pourquoi il a été choisi de travailler sur un modèle de développement de biofilm de 24 h. Les eaux minérales naturelles utilisées ont été supplémentées par ajout d'un milieu minimum apportant en concentration limitée mais suffisante les éléments nécessaires au développement reproductible et contrôlé de biofilms.

La conception et l'exploitation des réseaux d'eau sont des points essentiels au maintien de la qualité microbiologique de l'eau circulante. Cela concerne aussi bien le choix des matériaux, l'établissement d'un régime hydraulique, l'absence de bras morts et le recours à des produits de nettoyage et désinfection dans des conditions appropriées. Les réseaux de distribution d'eau thermale sont généralement conçus en inox 316 L ou PVC-C pour leur moindre aptitude à favoriser la croissance microbienne d'une part et leurs propriétés de résistance aux traitements thermiques d'autre part. Au niveau des postes de soins, l'utilisation d'une plus grande diversité

de matériaux est nécessaire pour répondre à des besoins de flexibilité et de raccordement, et pour limiter les coûts d'entretien et de remplacement des pièces. Les parties terminales des réseaux semblent être les plus vulnérables à la contamination. Il a été choisi dans ce travail, d'évaluer l'aptitude des matériaux à favoriser la formation de biofilm de *P. aeruginosa* dans des conditions de minéralisation imposée. Habituellement, la classification de l'aptitude des matériaux à favoriser la croissance microbienne est établie en eau déminéralisée ou en eau potable et il nous a semblé intéressant d'étudier l'interaction surface/bactérie dans un environnement minéral complexe. Les matériaux choisis correspondent au cuivre, à l'inox 316 L et au PVC-C, matériaux représentatifs de la partie principale du réseau de distribution, et au laiton, au polyéthylène (PE) et à l'éthylène-propylène-diène monomère (EPDM), matériaux représentatifs des points d'usage.

En complément des traitements appliqués au réseau de distribution, les postes de soins sont démontés et nettoyés à des fréquences variables avec des produits spécifiques. L'efficacité d'une séquence de nettoyage et désinfection utilisée dans un établissement thermal a donc été évaluée spécifiquement sur des biofilms de *P. aeruginosa* présents sur différents matériaux. Ces produits ont été utilisés en respectant leurs conditions d'application observées en établissement thermal.

Au cours des différentes expérimentations menées dans ces travaux de thèse, le biofilm a été étudié par marquage au cristal violet et par mesure de l'activité métabolique. Le cristal violet est un indicateur global de la formation de biofilm qui marque l'intégralité du biofilm sans distinction entre cellules bactériennes et matrice extracellulaire. La mesure de l'ATP intracellulaire a été utilisée pour évaluer l'activité métabolique globale des populations bactériennes présentes au sein des biofilms. D'autres techniques de microbiologie et de biologie moléculaire ont été utilisées pour étudier l'influence de la minéralisation sur la charge globale des cellules bactériennes et sur certains mécanismes bactériens impliqués dans la formation de biofilm. L'influence des matériaux sur la capacité de *P. aeruginosa* à former du biofilm a également été étudiée par observations au microscope électronique à balayage. Cette technique microscopique ne permet pas l'observation d'un biofilm réel du fait de l'exposition de celui-ci à des conditions destructives (déshydratation et vide poussé) lors de la préparation et de l'observation des échantillons. Cependant elle permet l'observation des microstructures de la surface des matériaux testés et reflète le nombre et l'organisation des cellules bactériennes adhérentes.

Deuxième partie :
Choix expérimentaux et
expérimentations préliminaire

Introduction.

Des expérimentations ont été réalisées préalablement à l'étude de l'influence de la minéralisation et des matériaux sur les capacités de *P. aeruginosa* à former du biofilm. Leurs objectifs étaient d'une part de caractériser les souches de *P. aeruginosa* et les eaux minérales naturelles conditionnées choisies et d'autre part de valider certains choix méthodologiques.

Un panel de neuf souches a été retenu pour cette étude, ce panel comprend la souche de référence PAO1, des souches d'origine environnementale isolées d'eau potable et d'eaux thermale et une souche clinique. Ces souches ont été caractérisées par typage par la méthode du Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA). Cette méthode permet d'assigner à chaque souche un code numérique dont chaque chiffre correspond au nombre de répétitions présentes à chaque locus (Vu-Thien *et al.*, 2007). Ce code renseigne sur la diversité du panel de souches et sur leur appartenance à une lignée spécifique et permet les comparaisons inter-laboratoires.

Les eaux minérales naturelles conditionnées retenues comme modèles d'eaux thermales ont été caractérisées préalablement à leur utilisation. Pour compléter les différents paramètres mentionnées sur leur étiquetage (concentrations en minéraux, résidu sec à 180 °C et pH), des mesures supplémentaires ont été effectuées. Ces dernières incluent la mesure de la conductivité comme indicateur global de la minéralisation, la mesure de la concentration en fer total et des analyses quantitatives de la flore autochtone de ces eaux.

L'utilisation de souches isolées d'eau potable s'appuie sur l'hypothèse que l'eau potable pouvant être utilisée pour le rinçage des réseaux de distribution d'eau minérale naturelle après traitement est susceptible d'être une source de contamination. Cependant si les souches apportées par cette eau de rinçage n'ont pas la capacité de survivre dans le contexte environnemental défini par les eaux minérales naturelles alors le risque de contamination qu'elle représente est négligeable. Des tests de survie ont donc été réalisés sur la souche environnementale MLM. Cette souche isolée d'eau potable a été incubée en parallèle dans deux conditions de minéralisation opposées :

- une condition de minéralisation forte modélisée à l'aide d'une eau minérale naturelle « réelle » provenant d'un établissement thermal.
- une condition de minéralisation faible modélisée à l'aide de l'eau minérale naturelle embouteillée faiblement minéralisée utilisée pour représenter une eau thermale dans cette étude.

Ces tests de survie ont été réalisés simultanément à des températures de 14 °C et de 37 °C pour chacune des conditions de minéralisation. Ces températures correspondent respectivement à la température de l'eau thermale à l'émergence et à la température à laquelle elle est utilisée pour certaines applications thérapeutiques. La survie de la souche a été évaluée par dénombrement sur milieu sélectif et non-sélectif.

Un modèle de formation de biofilm a été établi à partir de la culture des souches choisies dans un milieu minimum apportant les éléments nécessaires à une croissance en 24 h et préparés dans les trois eaux minérales embouteillées servant de modèle d'eaux thermales. Le contenu minéral de ces eaux est susceptible d'influencer la croissance planctonique des souches choisies et leur capacité de formation de biofilm pouvant en résulter. Des courbes de croissance ont donc été réalisées dans les différentes conditions de minéralisation sur l'ensemble des souches choisies pour valider ce modèle.

I. Matériel et méthodes.

1. Choix du panel de souches, constitution du souchier et standardisation de l'inoculum.

Neuf souches de *P. aeruginosa* ont été retenues pour cette étude. Ce panel inclut la souche de référence PAO1, six souches environnementales isolées de réseaux d'eau potable ou d'eau thermale ainsi que deux souches isogéniques d'origine clinique (ST395P) et d'origine environnementale (ST395E) isolées dans la même unité de soin intensif (USI) de l'hôpital de Besançon. Ces souches, la souche de référence PAO1 et la souche environnementale ST111 ont été fournies par le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires de Marseille (UMR CNRS 7255). Les souches environnementales D1 et D2 ont été fournies par le Laboratoire d'Hydrologie-Environnement de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de Bordeaux. Les souches E1 et E6 proviennent d'un même établissement thermal et ont été isolées respectivement d'eau potable et d'eau thermale. Dans le cas de la souche E1, un prélèvement de 250 ml d'eau potable a été effectué au premier jet d'un robinet de prélèvement d'un réseau de rinçage dans un flacon contenant du thiosulfate de sodium. Dans le cas de la souche E6, un prélèvement de 250 mL d'eau thermale a été effectué au niveau d'un poste de soins. Ces prélèvements ont été analysés selon la norme NF EN ISO 16266. Les souches ont été isolées successivement sur milieu sélectif cétrimide et milieu non-sélectif PCA (Plate Count Agar) avant d'être conservées sur cryobilles à – 80 °C.

Le typage des souches a été réalisé par la méthode du Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA) basée sur l'analyse des 16 VNTRs suivant : ms77, ms127, ms142, ms172, ms211, ms212, ms213, ms214, ms215, ms216, ms217, ms222, ms223, ms61, ms207 et ms209 (CEERAM - La Chapelle sur Erdre, Nantes). Les codes numériques générés pour chacune des souches retenues ont été analysés à l'aide de la banque de données publiques MLVABank qui regroupe les typages de différentes espèces de microorganismes dont *P. aeruginosa* (Grissa *et al.*, 2008).

Dans un souci de répétabilité la culture des souches a été standardisée (figure 10). Toutes les souches du panel ont été conservées sur cryobilles à – 80 °C. Un milieu sélectif cétrimide a été ensemencé avec une cryobille et mis à incuber 24 h à 37 °C. Une colonie développée sur ce milieu a ensuite été utilisée pour ensemencer un milieu non-sélectif PCA incubé 24 h à 37 °C. Une colonie développée sur ce milieu a à son tour été utilisée pour ensemencer 10 mL de milieu Luria Broth (LB) incubés pendant la nuit à 30 °C sous agitation transversale. Cette sous-culture

constitue l'inoculum et a été utilisée pour ensemer des eaux minérales naturelles embouteillées ou un milieu minimum préparé dans ces eaux minérales conditionnées.

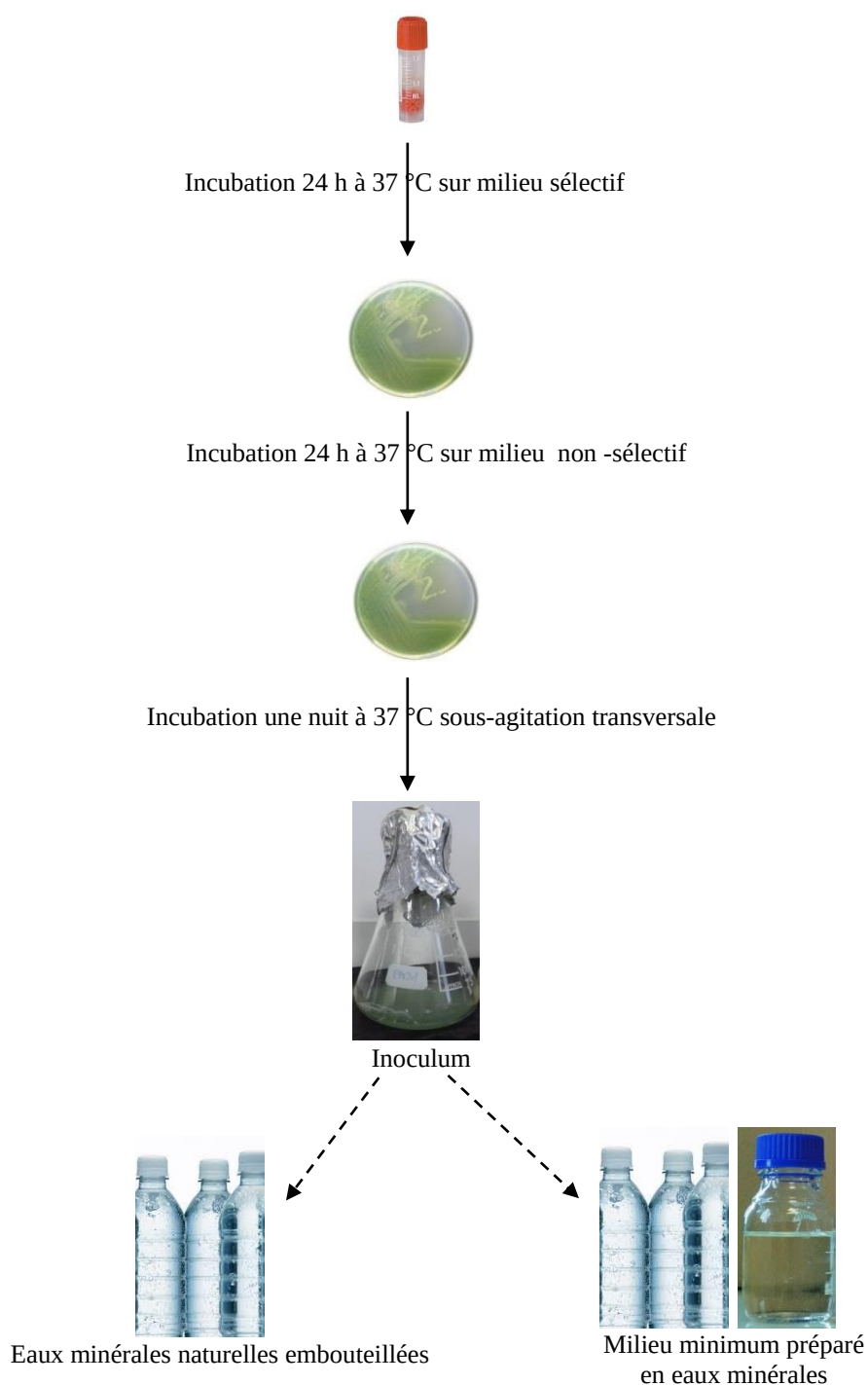


Figure 10 : Préparation de l'inoculum : culture standardisée.

2. Caractérisation des eaux minérales naturelles embouteillées.

Trois eaux minérales naturelles embouteillées, caractérisées par un contenu minéral dit faible, moyen ou fort basé sur la valeur de leur résidu sec à 180 °C, ont été choisies pour étudier l'impact du niveau de minéralisation de l'eau sur les capacités de développement d'un panel de neuf souches de *P. aeruginosa*.

En supplément des informations mentionnées sur l'étiquetage, certains paramètres physicochimiques et microbiologiques complémentaires ont été mesurés tels que la conductivité, la concentration en fer total et le dénombrement de la flore autochtone cultivable. La valeur de la conductivité des eaux minérales naturelles correspond à la moyenne de trois mesures effectuées à 22 °C. Les mesures de concentration en fer total ont été effectuées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) suivant la norme NF EN ISO 17294-2 (T90-164) (Laboratoire Inovalys-Nantes, France). L'analyse quantitative de la flore autochtone cultivable des eaux minérales naturelles a été réalisée par la technique des ufc sur milieu R2A pour chacune des eaux, incubation une semaine à 22 °C et dénombrement. La valeur indiquée correspond à la moyenne de trois mesures.

3. Tests de survie.

L'inoculum en milieu LB de la souche environnementale MLM a été centrifugé 10 min à 7 000 g. Après élimination du surnageant, le culot obtenu a été suspendu dans 32 mL d'eau ultra-pure. Cette suspension a été répartie dans huit 8 flacons stériles de 250 mL à raison de 4 mL par flacon. Quatre flacons ont ensuite été remplis avec de l'eau faiblement minéralisée et les quatre flacons restants avec de l'eau thermale dont les caractéristiques physicochimiques sont présentées dans le tableau 16. La concentration bactérienne de la suspension de chacun des flacons avant incubation est comprise entre $4,8.10^7$ et $7,0.10^7$ ufc/mL.

L'eau thermale utilisée est caractérisée par sa concentration en sulfures (tableau 16). Cet élément a tendance à précipiter par réaction d'oxygénation c'est pourquoi chacun des flacons a été fermé à l'aide d'un bouchon muni d'un septum en silicone de façon à limiter l'entrée d'oxygène lors de la réalisation des prélèvements.

Deux flacons par type d'eau ont été incubés à 14 °C et à 37 °C.

Tableau 16 : Caractéristiques physicochimiques de l'eau thermique utilisée pour les tests de survie telles qu'indiquées par l'établissement thermal.

Paramètres	Concentration	
	mg/L	mM
Ca ²⁺	162	4,04
Mg ²⁺	16,5	0,68
Na ⁺	36,7	1,60
K ⁺	7,6	0,19
SO ₄ ²⁻	156	2,74
NO ₃ ⁻	< 0,5	0,01
Cl ⁻	97	1,62
HCO ₃ ⁻	ni	ni
H ₂ S	22	0,65
pH	7,35	
Résidu sec à 180 °C (mg/L)	680	
Conductivité à 25 °C (µS/cm)	1050	
Concentration en fer total (mg/L)	< 0,02	

ni : non indiqué

Des prélèvements de 2 mL par flacons ont été réalisés à la seringue à travers le septum, flacon renversé pour atteindre la suspension. Ces prélèvements ont été effectués quotidiennement pendant les 20 premiers jours d'incubation puis 1 à 2 fois par semaine de 20 à 75 jours d'incubation. Des dilutions en cascade ont été réalisées dans 9 mL d'eau stérile à partir de ces prélèvements : 0,1 mL des dilutions comprises entre 10⁰ et 10⁻⁶ inclus ont été étalés sur milieu sélectif cétrimide et sur milieu non-sélectif PCA. Les colonies obtenues après 24 h d'incubation à 37 °C ont été dénombrées pour chacune des conditions expérimentales (figure 11).

L'effet des conditions expérimentales sur les capacités de survie de la souche MLM a été évalué par calcul du temps nécessaire à la mort de 90 % de la population bactérienne initiale (T₉₀) suivant l'équation $T_{90} = -t/\log(C/C_0)$ où C₀ représente la concentration en bactérie initiale et C la concentration en bactérie au temps t exprimé en jours (Khalaphallah et Andres, 2012).

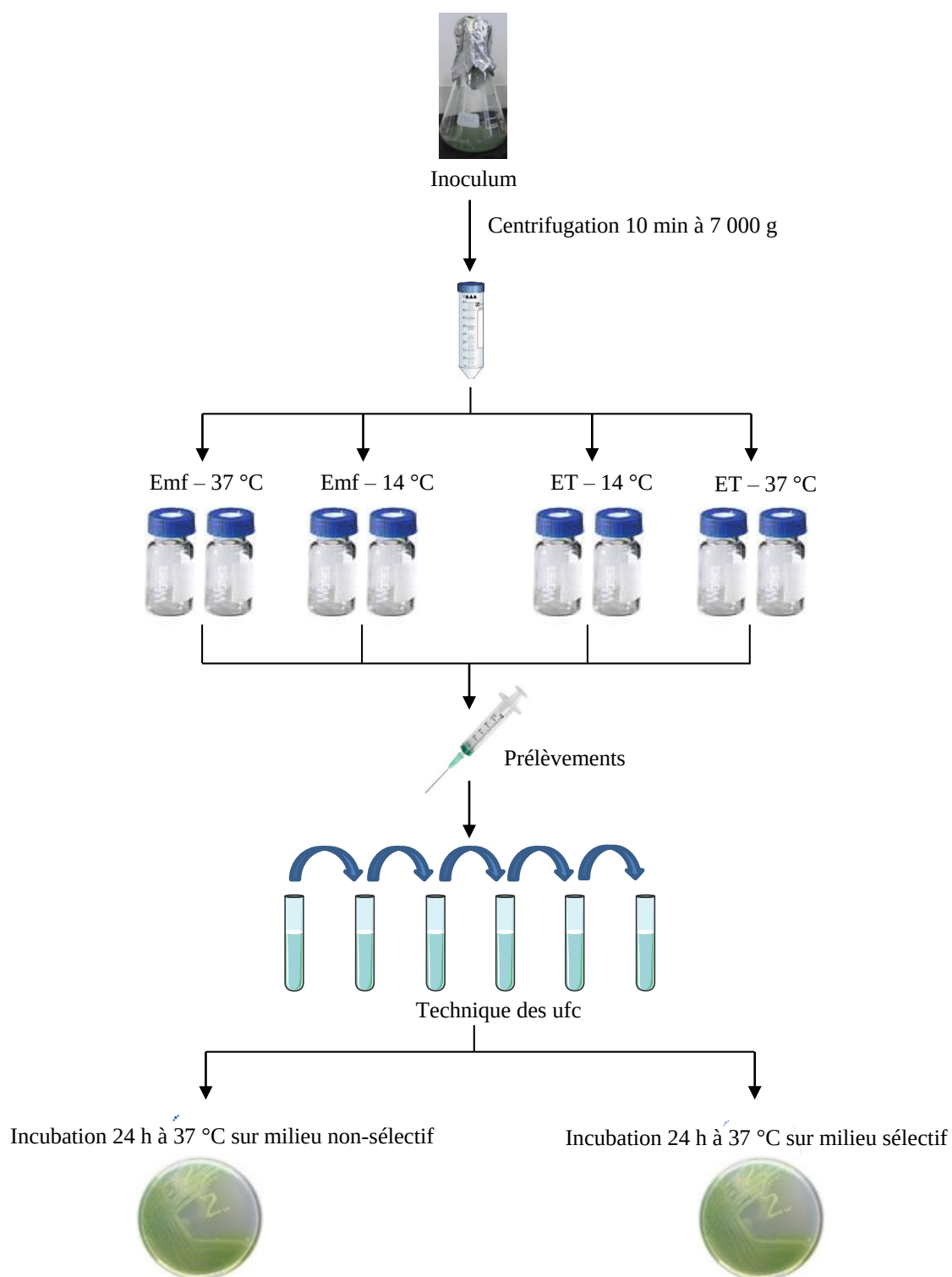


Figure 11 : Etapes de la réalisation des tests de survie (Emf : eau minérale naturelle faiblement minéralisée ; ET : eau thermique).

4. Courbes de croissance.

Du milieu minimum M63 concentré 10 fois (20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30 g KH_2PO_4 et 70 g K_2HPO_4 pour 1 L d'eau ultra-pure) a été dilué dans chacune des trois eaux minérales naturelles étudiées et supplémenté à 0,5 % en acides casamines, à 0,2 % en glucose et à 1 mM en MgCl_2 . Pour chacune des neuf souches du panel, 10 mL de chacun des trois milieux M63 ont étéensemencés à une densité optique à 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,1 à partir des sous-cultures en LB. Une lecture de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de chacune des cultures a été effectuée après 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h et 24 h d'incubation à 37 °C sous-agitation transversale. Les mesures ont été effectuées sur des prélèvements de culture non-dilués à 2 h et à 4 h, dilués au 1/5^{ème} à 6 h et dilués au 1/10^{ème} à 8 h, 16 h et 24 h. Les dilutions ont été réalisées dans chacun des milieux M63 stériles correspondant.

II. Résultats.

1. Caractérisation des souches.

Les caractéristiques des souches retenues pour constituer le panel testé dans ces travaux de thèse sont présentées dans le tableau 17. Les souches MLM et ST395E, toutes deux isolées de réseaux de distribution de milieux hospitaliers, présentent des typages MLVA très proches, différant d'un seul VNTR (ms61). Les souches E1 et E6, isolées au sein d'un même établissement thermal mais provenant respectivement d'un réseau de distribution d'eau potable et d'un réseau de distribution d'eau thermique, présentent également un typage MLVA similaire, différant d'un seul VNTR (ms77).

Tableau 17 : Détails du panel de souches utilisé dans cette étude.

Nom	Lieu d'isolation	Origine	Typage MLVA	Référence
MLM	H_1	Eau potable – évier d'une salle de consultation	3 ; 8 ; 4 ; 10 ; 3 ; 5 ; 5 ; 5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 1 ; 3 ; 5 ; 4 ; 8	-
ST395E	H_3	Eau potable – évier d'une USI	3 ; 8 ; 4 ; 10 ; 3 ; 5 ; 5 ; 5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 1 ; 3 ; 6 ; 4 ; 8	Lucchetti-Miganeh <i>et al.</i> , 2014
ST395P	H_3	Souche clinique – patient d'une USI	Non typable	Lucchetti-Miganeh <i>et al.</i> , 2014
D1	ITh_1	Eau thermique	3 ; 8 ; 4 ; 11 ; 2 ; 6 ; 9 ; 2 ; 1 ; 2 ; 2 ; 1 ; 3 ; 9 ; 8 ; 5	-
D2	ITh_1	Eau thermique	3.5 ; 9 ; 1 ; 12 ; 3 ; 9 ; 3 ; 6 ; 2 ; na ; na ; 3 ; 4 ; 7 ; 10 ; 3	-
E6	ITh_2	Eau thermique	2.5 ; 9 ; 1 ; 12 ; 2 ; 4 ; 1 ; 5 ; 2 ; 1 ; 5 ; 2 ; 4 ; 12 ; 5 ; 6	-
E1	ITh_2	Eau potable – réseau de rinçage	2 ; 9 ; 1 ; 12 ; 2 ; 4 ; 1 ; 5 ; 2 ; 1 ; 5 ; 2 ; 4 ; 12 ; 5 ; 6	-
ST111	H_2	Eau potable	3 ; 8 ; 4 ; 11 ; 3 ; 9 ; 4.5 ; 3 ; 2 ; 2 ; 2 ; 2 ; 2 ; 5 ; 6 ; 5	
PAO1	-	Souche de référence isolée d'une plaie en 1954	4 ; 8 ; 7 ; 12 ; 5 ; 9 ; 5 ; 3 ; 4 ; 3 ; 2 ; 2 ; 4 ; 12 ; 8 ; 6	Holloway <i>et al.</i> , 1955

ITh : Institut thermal, H : Hôpital, na : allèle non assigné

Les résultats issus de la comparaison des codes numériques associés à chacune des souches à ceux répertoriés dans la base de données MLVABank (Grissa *et al.*, 2008) sont présentés dans le tableau 18. Ils mettent en évidence l'appartenance de la souche E1 à la lignée de la souche PA14, leurs codes VNTR étant identiques (Vu-Thien *et al.*, 2007). De la même façon, la souche E6 ne diffère que d'un VNTR (ms77) de la souche PA14 (Vu-Thien *et al.*, 2007). Les souches MLM et ST395E, isolées d'eau potable en milieu hospitalier, présentent une certaine

correspondance avec des souches isolées de patients atteints de mucoviscidose. Elles ne diffèrent que de deux VNTR (ms77 et ms61) avec ces dernières (Vu-Thien *et al.*, 2007). La souche ST111, isolée d'eau potable en milieu hospitalier, présente une correspondance avec les souches RO13 et PA396 respectivement isolées d'aspiration trachéale et d'échantillon sanguin. Elle diffère de ces dernières de trois VNTR (ms77, ms211 et ms61) (Larché *et al.*, 2012). Les souches D1 et D2, isolées d'eaux thermales, ne présentent aucune correspondance avec les souches répertoriées dans la base de données.

Tableau 18 : Résultats de la comparaison des codes VNTR des souches du panel avec ceux des souches de *P. aeruginosa* répertoriées dans la banque de donnée MLVAbank (dernière consultation le 4 septembre 2015).

Souches du panel	Souches similaires		Différences			Référence
	Identité	Isolement	Distance*	VNTR concernés	Nature (panel vs similaire)	
MLM	TR_S0502271 TR_S0502831 TR_S0600490 TR_S0600983 TR_S0601223 TR_S0601938 TR_S0602282 TR_S0602521 TR_S0703292	patients atteints de mucoviscidose	2	ms77 ms61	2,5 vs 3 non analysé	Vu-Thien <i>et al.</i> , 2007
ST395E	TR_S0502271 TR_S0502831 TR_S0600490 TR_S0600983 TR_S0601223 TR_S0601938 TR_S0602282 TR_S0602521 TR_S0703292	patients atteints de mucoviscidose	2	ms77 ms61	2,5 vs 3 non analysé	Vu-Thien <i>et al.</i> , 2007
D1	pas de correspondance					
D2	pas de correspondance					
E6	PA14	clinique	1	ms77	2,5 vs 2	Vu-Thien <i>et al.</i> , 2007
E1	PA14	clinique	0	-	-	Vu-Thien <i>et al.</i> , 2007
ST111	RO13 PA396	aspiration trachéale sang	3	ms77 ms211 ms61	3 vs 2,5 3 vs 4 non analysés	Larché <i>et al.</i> , 2012
PAO1	PAO1	souche de référence	1	ms207	8 vs 7	Larché <i>et al.</i> , 2012

*nombre de VNTR différents

2. Caractérisation des eaux minérales naturelles embouteillées.

Les caractéristiques physicochimiques des eaux minérales embouteillées mentionnées sur l'étiquetage ou mesurées dans le cadre de ces travaux de thèse (conductivité à 22 °C, concentration en fer total et dénombrement de la flore bactérienne cultivable) sont présentées dans le tableau 19.

Ces trois eaux ont un pH proche de la neutralité, une faible concentration en fer total et une flore bactérienne cultivable présente à une concentration de l'ordre de 10^4 ufc/mL. Ces eaux minérales naturelles se distinguent par leur contenu minéral. Le contenu minéral global de chacun des niveaux de minéralisation, reflété par le résidu sec à 180 °C, est séparé d'un facteur 3. L'eau faiblement minéralisée est caractérisée par la présence d'ions en concentrations équilibrées, généralement comprises entre 0,3 et 1 Mm, excepté pour les sulfates présents en très faible concentration. A l'inverse, les eaux moyennement et fortement minéralisées sont caractérisées par un déséquilibre des concentrations des éléments présents, avec des concentrations en Ca^{2+} et en Mg^{2+} près de 10 fois plus fortes que celles des autres composants. L'eau fortement minéralisée se distingue également par sa forte concentration en sulfates.

Tableau 19 : Caractéristiques des eaux minérales naturelles embouteillées utilisées dans cette étude.

Paramètres	Minéralisation faible		Minéralisation moyenne		Minéralisation forte	
	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
Ca^{2+} *	11,5	0,29	80,0	2,00	203,8	5,09
Mg^{2+} *	8,0	0,33	26,0	1,07	43,1	1,77
Na^{+} *	11,6	0,50	6,5	0,28	5,0	0,22
K^{+} *	6,2	0,16	1,0	0,03	2,0	0,05
SO_4^{2-} *	8,1	0,03	12,6	0,13	328,9	3,42
NO_3^{-} *	6,3	0,10	3,7	0,06	4,3	0,07
Cl^{-} *	13,5	0,10	6,8	0,19	8,0	0,23
HCO_3^{-} *	71,0	1,16	360,0	5,90	399,0	6,54
pH*	7,0		7,2		7,5	
Résidu sec à 180 °C (mg/L)*	130		309		1084	
Conductivité à 22 °C ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	$153,4 \pm 10$		$442,0 \pm 33$		$743,0 \pm 44$	
Concentration en fer total ($\mu\text{g}/\text{L}$)	< 12,0		< 12,0		< 12,0	
Flore bactérienne cultivable – analyse quantitative (10^4 ufc/mL)	$5,42 \pm 1,09$		$3,27 \pm 0,44$		$3,18 \pm 0,72$	

* mentionnées sur l'étiquetage.

3. Tests de survie.

Les capacités de survie de la souche environnementale MLM isolée d'eau potable ont été évaluées dans l'eau thermale et dans l'eau minérale embouteillée faiblement minéralisée. Ces tests de survie ont été effectués à des températures de 14 °C et de 37 °C correspondant respectivement à la température de l'eau thermale à l'émergence et à la température à laquelle elle est utilisée pour les soins.

Les résultats de dénombrements des cellules cultivables obtenus étaient généralement plus faibles sur milieu sélectif que sur milieu non-sélectif pour les flacons incubés à 14 °C : dans le cas de l'eau thermale, une différence de 2 log est observable tout au long du test de survie (figure 12A et B). Dans le cas de l'eau minérale naturelle faiblement minéralisée une différence d'au moins un log est observable à partir de 42 jours d'incubation et tend à augmenter (figure 13A et B). Ces résultats suggèrent que l'eau thermale induit un stress plus important pour la souche que l'eau minérale naturelle faiblement minéralisée. Ce stress se traduit par une moindre capacité à croître sur un milieu plus contraignant tel que le milieu sélectif. Pour limiter le biais lié à ce stress, les résultats suivant sont basés sur les dénombrements effectués sur milieu non-sélectif.

La survie de MLM est de plus de 75 jours dans les deux conditions de minéralisation et qu'elle que soit la température considérée (figures 12B et 13B). Pour les deux conditions de minéralisation, la décroissance de la concentration de la population bactérienne initialement présente est plus rapide à 37 °C qu'à 14 °C. A 37 °C, dans les deux eaux, la concentration de la population bactérienne augmente ou stagne sur les 12 premiers jours d'incubation puis en eau thermale cette concentration décroît puis stagne à partir de 52 jours d'incubation tandis qu'en eau faiblement minéralisée cette concentration stagne puis décroît à partir de 48 jours d'incubation. A 14 °C, cette concentration décroît plus rapidement en eau thermale qu'en eau minérale naturelle faiblement minéralisée.

Le calcul du temps nécessaire à la mort de 90 % de la population bactérienne initialement présente (tableau 20) montre un temps de survie plus important dans l'eau faiblement minéralisée que dans l'eau thermale pour les populations incubées à 37 °C. Ces temps de survie sont relativement similaires dans les deux eaux pour les populations incubées à 14 °C. En eau thermale, le temps de survie est plus important à 14 °C qu'à 37 °C. En eau faiblement minéralisée ce temps est similaire entre les deux températures testées.

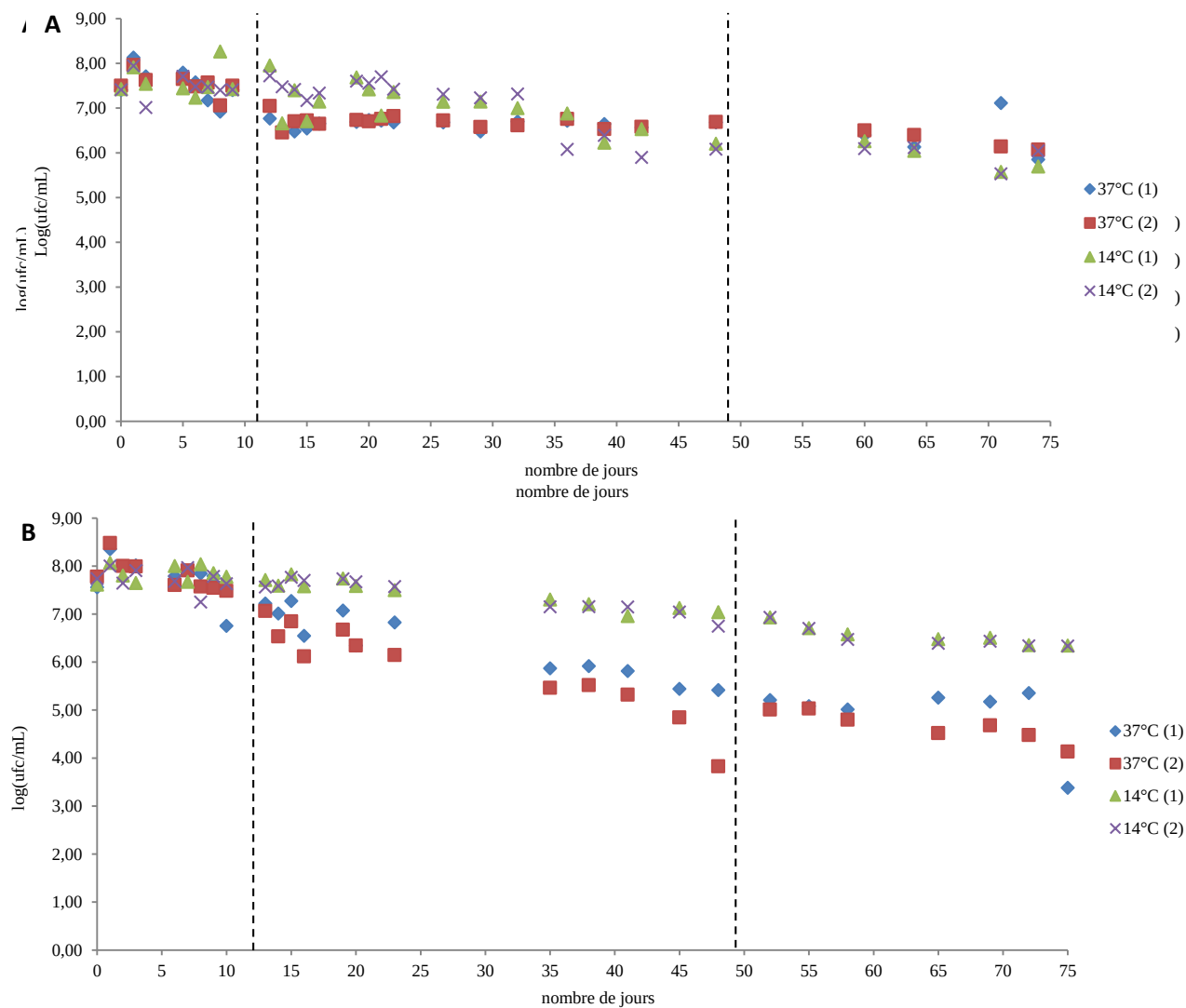


Figure 12 : Courbes de survie de la souche MLM en eau thermale à 37 °C et à 14 °C – dénombrement sur (A) milieu sélectif et (B) milieu non-sélectif.

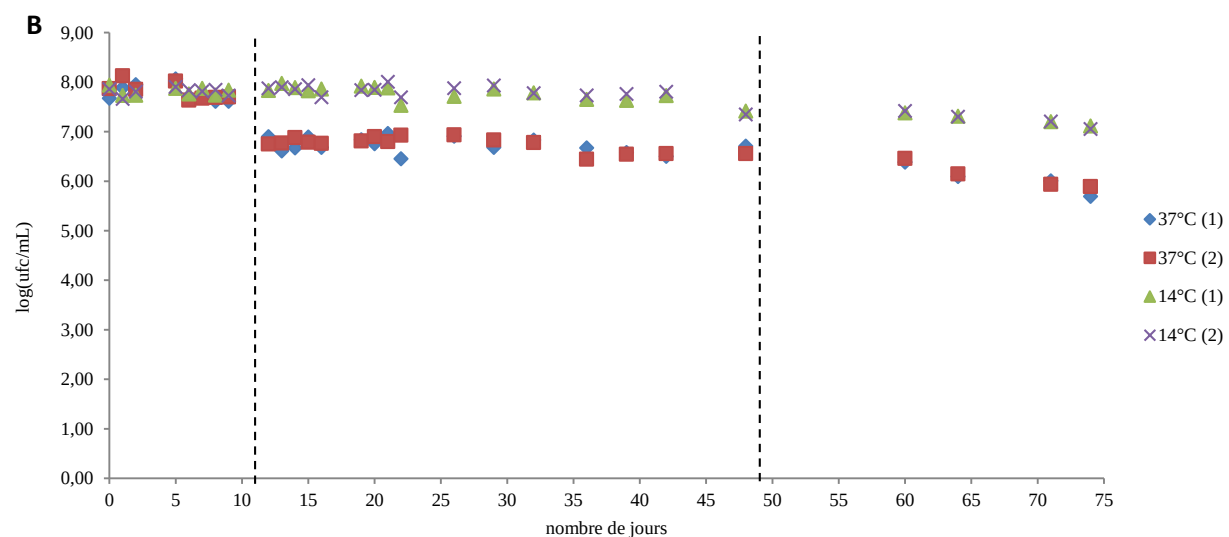


Figure 13 : Courbes de
 en eau minérale naturelle faiblement minéralisée à 37 °C et à 14 °C – dénombrement sur (A) milieu sélectif et (B) milieu non-sélectif.

survie de la souche MLM

Tableau 20 : T₉₀ des populations bactériennes incubées à 37 °C ou à 14 °C en eau thermale ou en eau minérale naturelle faiblement minéralisée.

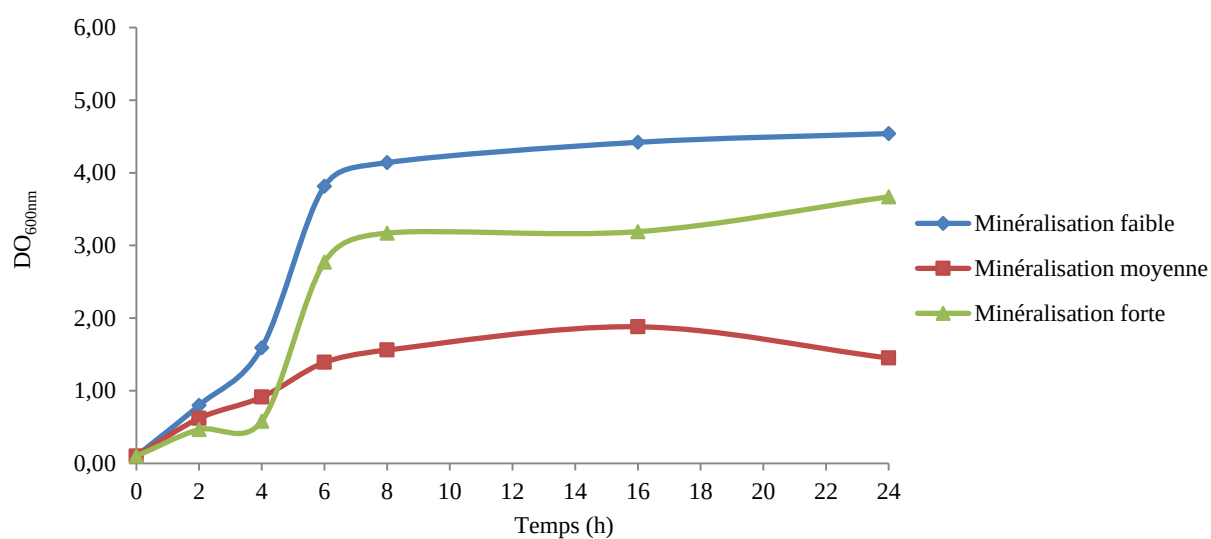
Température	Flacon	T ₉₀ (jours)	
		Eau thermale	Eau minérale faiblement minéralisée
37 °C	1	48	66
	2	52	60
14 °C	1	70	65
	2	61	66

4. Courbes de croissance.

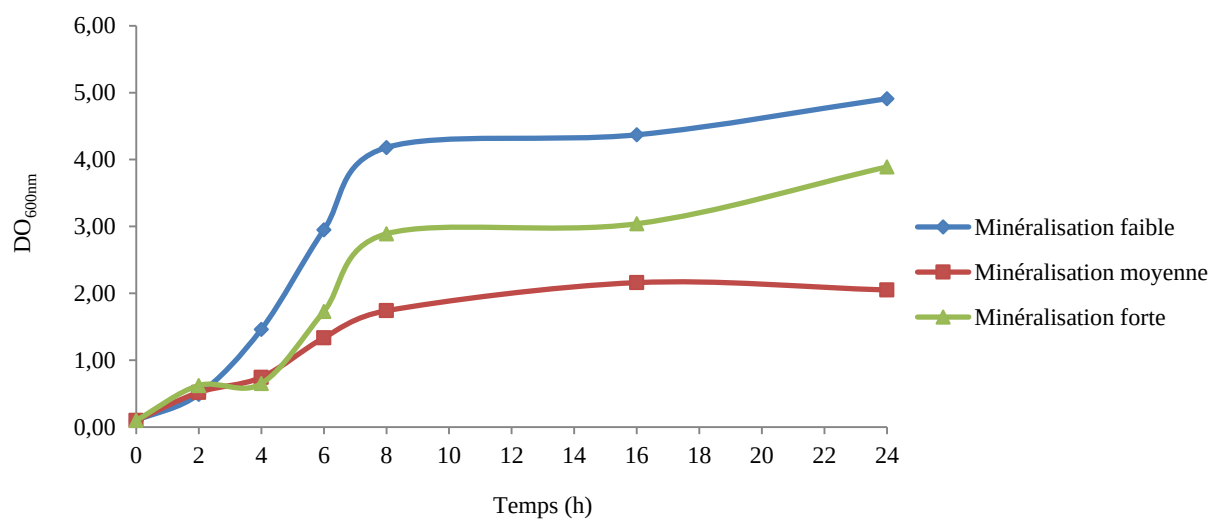
La comparaison de la croissance des souches dans les différentes conditions de minéralisation (figure 14) montre des valeurs de DO_{600nm} à 24 h généralement moins élevées en conditions de minéralisation moyenne qu'en conditions de minéralisation faible ou forte notamment pour les souches MLM, ST395E, D2, E1 et PAO1. Les valeurs de DO_{600nm} obtenues à 24 h en minéralisation faible et forte sont généralement similaires pour l'ensemble du panel de souches.

En comparant les courbes de croissance des souches toute minéralisation confondue on remarque que la croissance des souches MLM, D1, D2, E1 et PAO1 est caractérisée par une phase de latence comprise entre 0 et 2 h suivi d'une phase de croissance exponentielle entre 2 et 6 h puis d'une phase de croissance stationnaire entre 6 et 24 h tandis que la croissance des souches ST395P, ST395E, ST111 et E6 est caractérisée par une phase de latence comprise entre 0 et 4 h suivie d'une phase de croissance exponentielle entre 6 et 8 h et une phase de croissance stationnaire entre 8 et 24 h. Les valeurs de DO_{600nm} atteintes par chacune des cultures au bout de 24 h de croissance sont fortement similaires pour l'ensemble du panel, excepté pour les souches ST111 et E6 qui montrent des valeurs de DO_{600nm} plus faibles en condition de minéralisation faible.

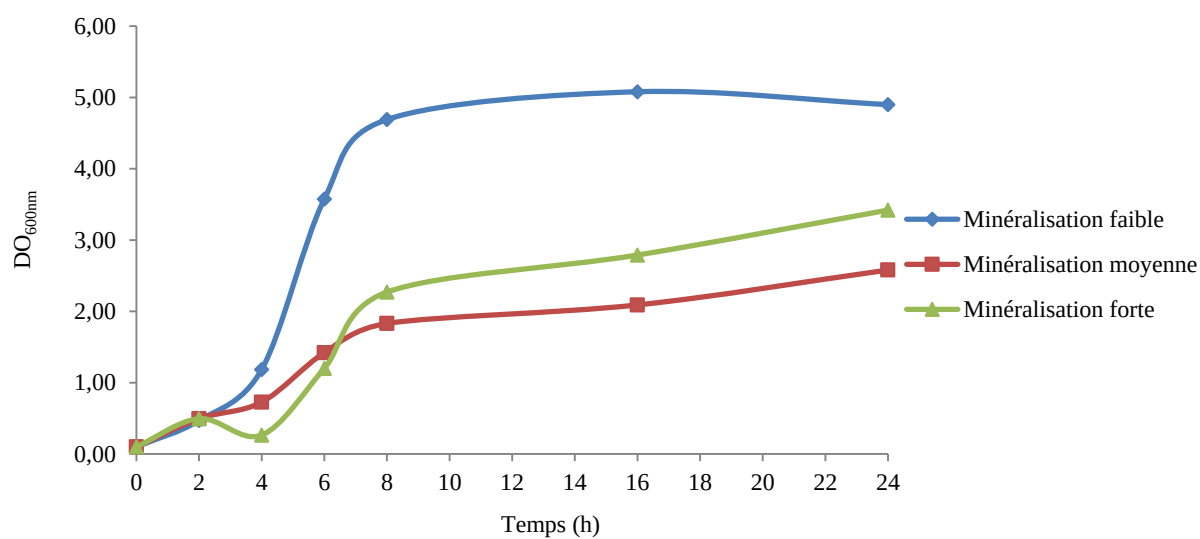
MLM

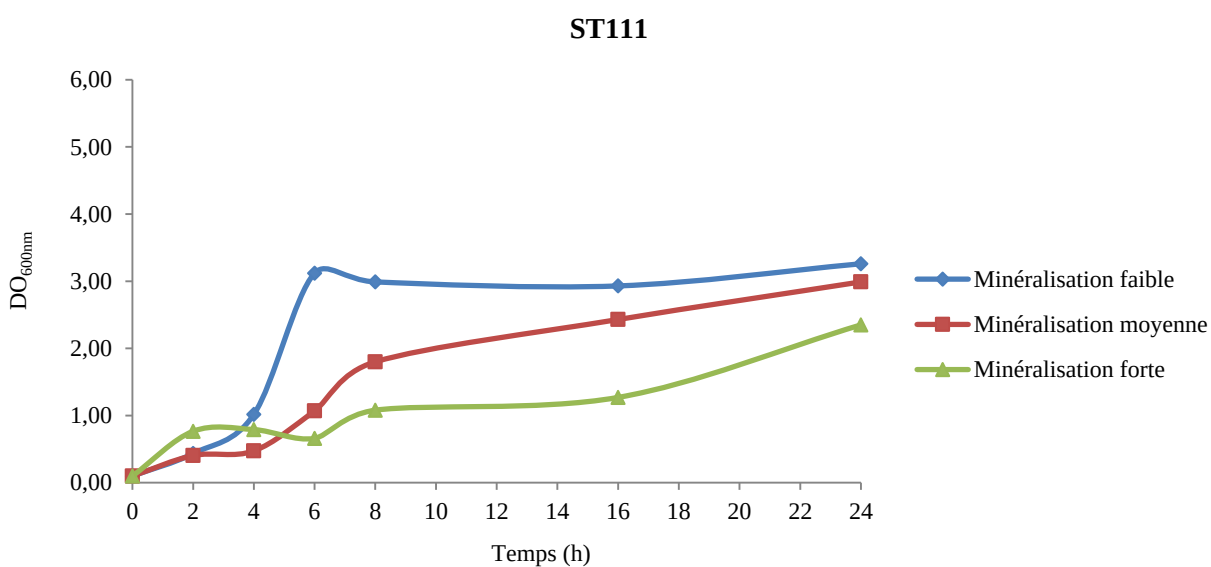
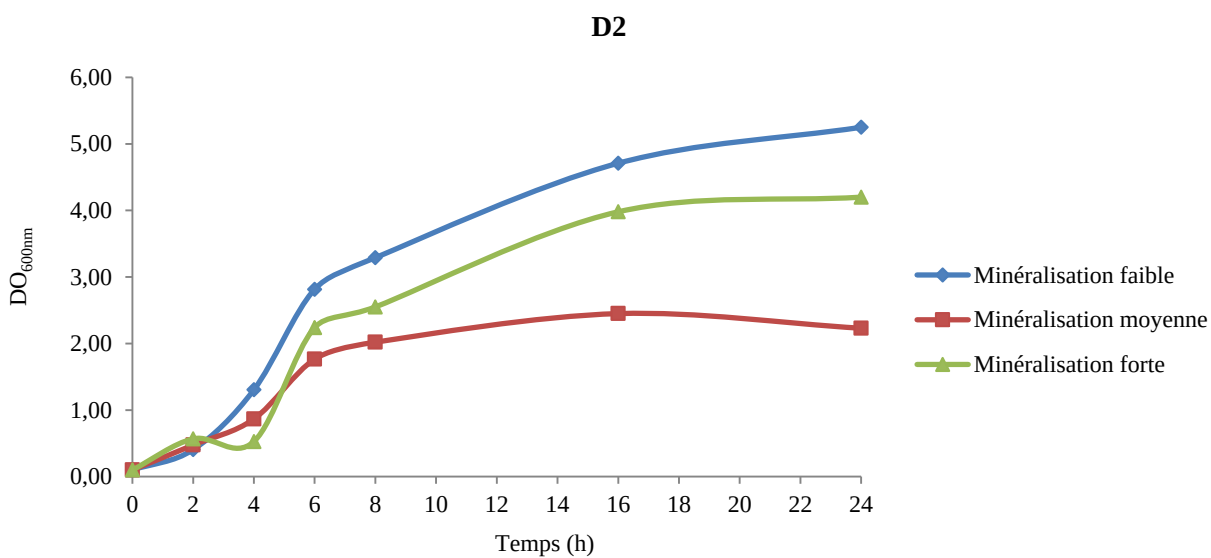
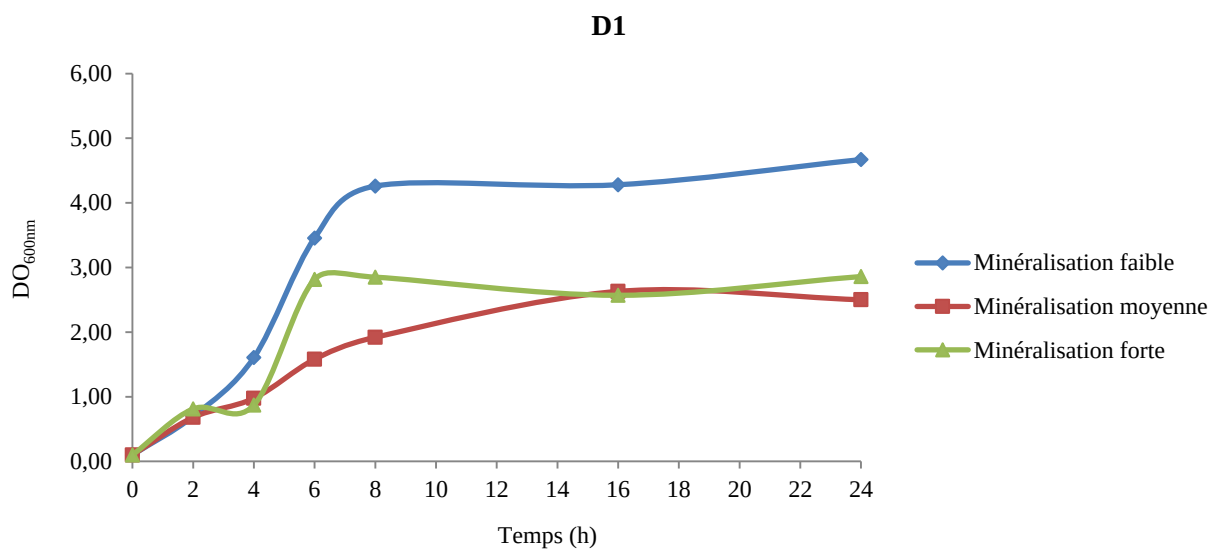


ST395 E



ST395 P





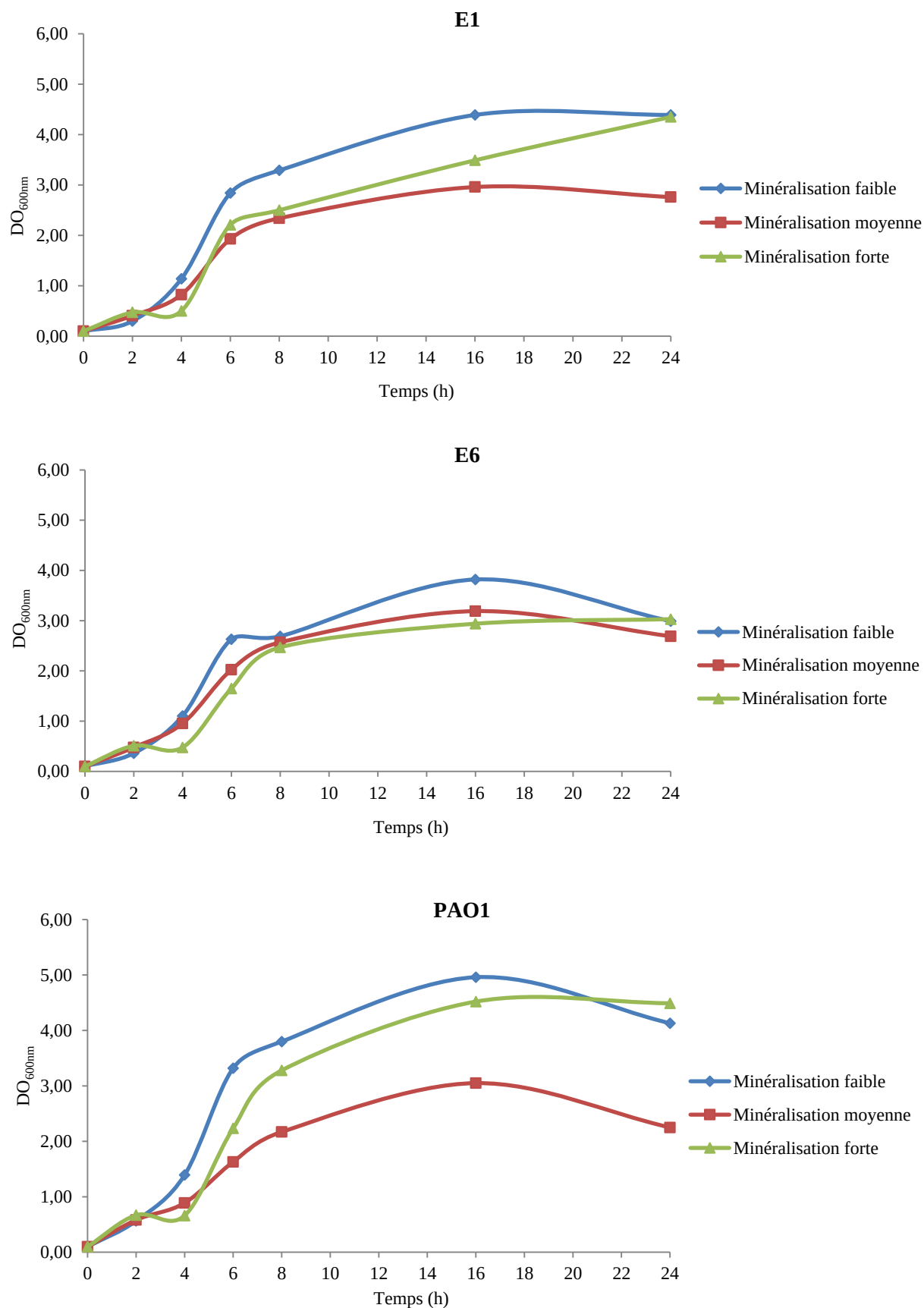


Figure 14 : Courbes de croissance des souches du panel en milieu minimum M63 préparé en eau faiblement, moyennement ou fortement minéralisés à 37 °C sous-agitation transversale.

IV. Discussion.

La caractérisation des souches et des eaux utilisées et la validation de certains choix méthodologiques sont un préalable indispensable à la compréhension de l'influence des eaux minérales naturelles sur le comportement de *P. aeruginosa*.

La caractérisation des souches met en évidence la diversité du panel de souches retenues. La correspondance de typage entre les souches MLM et ST395E d'une part et les souches E1 et E6 d'autre part suggère que ces souches sont susceptibles d'avoir des comportements similaires selon les conditions de minéralisation auxquelles elles sont exposées.

Les eaux minérales naturelles sont caractérisées par leur contenu minéral complexe (Diduch *et al.*, 2011). Les eaux minérales naturelles conditionnées retenues pour modéliser des eaux minérales utilisées à des fins thérapeutiques en établissements thermaux correspondent bien à cette définition. L'eau faiblement minéralisée se distingue des eaux moyennement et fortement minéralisées par l'équilibre des concentrations de ses différents sels minéraux (figure 15). Ces différences de compositions sont susceptibles d'impacter les capacités de survie et de croissance de *P. aeruginosa*.

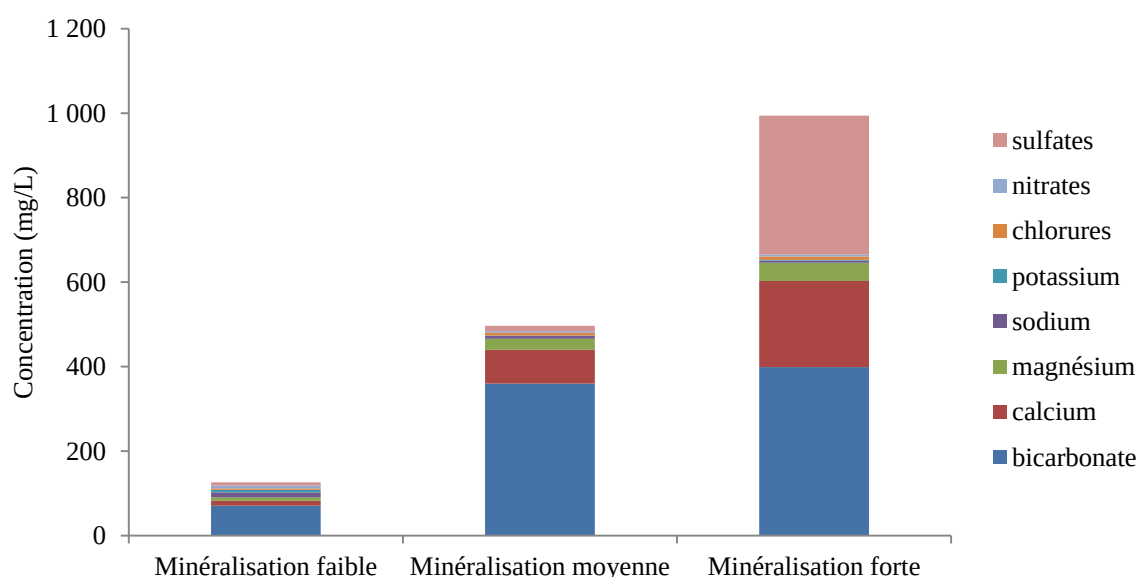


Figure 15 : Somme cumulée des concentrations en mg/L des principaux ions des eaux minérales naturelles conditionnées utilisées dans cette étude comme modèles d'eaux thermales.

La souche environnementale MLM isolée d'eau potable est capable de survivre plus de deux mois en eau thermale et en eau minérale naturelle embouteillée sans aucun apport nutritif et en conditions d'oxygénation limitées. D'après le calcul du temps nécessaire à la mort de 90 % des cellules bactériennes initialement présentes, la survie de la bactérie est équivalente dans les deux conditions de minéralisation à 14 °C mais est plus longue d'une dizaine de jours en eau faiblement minéralisée qu'en eau thermale fortement minéralisée à 37 °C. L'effet de la température sur la survie de *P. aeruginosa* a été rapporté dans la littérature. Khalaphallah et Andres (2012) ont montré que la survie d'une souche environnementale de *P. aeruginosa*, isolée d'eaux grises de salle de bain, est moins longue à 42 °C $\pm$ 2 °C qu'à 6 $\pm$ 2 °C ou à 23 °C $\pm$ 2 °C. Les faibles températures sont en effet connues pour limiter le métabolisme des bactéries leur assurant une dépense énergétique moindre et une survie plus longue (Khalaphallah et Andres, 2012).

Les résultats de tests de survie en eaux minérales naturelles obtenus sont cohérents avec ceux obtenus par Legnani *et al.* (1999). Ces derniers démontrent que deux souches environnementales de *P. aeruginosa* isolées de systèmes de stockage de l'eau de rinçage de lignes d'embouteillage d'eau minérale naturelle, sont capables de survivre entre 3 et 5 ans en eaux minérales naturelles à température ambiante (19 à 24 °C). La survie de ces souches a ainsi été estimée à 1 200 jours en eau moyennement minéralisée (résidu sec à 180 °C = 382 mg/L) et à 1 500 jours en eau faiblement minéralisée (résidu sec à 180 °C = 72,5 mg/L). La survie de ces souches est caractérisée par une phase de latence de 3 à 6 h puis par une phase de croissance se terminant en fin de première semaine d'incubation avec un maximum de croissance atteint après 2 jours d'incubation en eau faiblement minéralisée et après 3 jours d'incubation en eau moyennement minéralisée. Cette phase de croissance est suivie d'une phase de développement stationnaire se finissant après 70 à 100 jours d'incubation et suivie d'une phase de décroissance graduelle (Legnani *et al.*, 1999). Ce profil de survie est similaire à ceux observés ici en eau faiblement minéralisée. Les différences observées sur les profils obtenus en eau thermale peuvent s'expliquer par le fort contenu minéral de cette eau et ses spécificités de composition. Les spécificités des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques en établissement thermal rendent impossible l'adoption d'un modèle universel. Malgré les différences de phase de survie observées entre les deux conditions de minéralisation testées, les niveaux de concentration cellulaires atteints sont fortement similaires après 75 jours d'incubation pour chacune des conditions de températures. L'ensemble des observations faites

ici suggère que le modèle d'eau minérale utilisé est valide bien qu'il ne semble pas refléter à l'identique le comportement de la souche testée en eau thermique réelle.

La survie de la souche MLM en eau minérale naturelle à 37 °C et à 14 °C appuie l'hypothèse de la possibilité d'une contamination du réseau de distribution par une souche environnementale provenant de l'eau potable de rinçage utilisée au cours des séquences de nettoyage et de désinfection. Ces résultats justifient l'étude du comportement de souches environnementales isolées d'eau potable.

Le modèle de développement de biofilm de *P. aeruginosa* en eaux minérales naturelles conditionnées supplémentées par dilution d'un milieu minimum est validé par les résultats de courbes de croissance obtenus dans ces expérimentations préliminaires. La croissance de la majorité des souches ne montre pas de différence importante selon la minéralisation ou la souche considérée. Toutefois en eau moyennement minéralisée les valeurs de DO_{600nm} obtenues après 24 h de croissance sont plus faibles que dans les autres conditions de minéralisation pour quelques souches du panel suggérant un impact potentiel sur le développement de biofilm.

Les expérimentations préliminaires ont permis de caractériser les souches et les eaux minérales naturelles utilisées et de valider certains choix méthodologiques telles que l'étude de souches isolées d'eau potable, l'utilisation d'eaux minérales naturelles embouteillées comme modèle d'eaux thermales et les conditions de culture du panel de souches utilisés. Ces validations permettent de poursuivre les expérimentations en commençant par l'étude de l'influence de la minéralisation sur les capacités de *P. aeruginosa* à former du biofilm.

Troisième partie :

**Influence de la minéralisation sur la
capacité de *P. aeruginosa* à former du
biofilm.**

I. Introduction.

Les eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques en établissements thermaux se doivent d'être exemptes de tout microorganisme pathogène. Elles sont à ce titre soumises à des exigences de qualité microbiologique draconiennes et à des contrôles microbiologiques très stricts. La réglementation française impose l'absence de *Legionella pneumophila* dans tout échantillon contrôle de 1 000 mL, l'absence d'*Escherichia coli*, de coliformes totaux, de streptocoques fécaux et de *P. aeruginosa* dans tout échantillon contrôle de 250 mL et l'absence de bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans tout échantillon contrôle de 50 mL (DGS, 2000). Le maintien de cette qualité microbiologique dans les établissements thermaux est assuré par la mise en place et l'application régulière de procédures de traitement associant des séquences de nettoyage et de désinfection. Malgré ces précautions, les établissements thermaux sont régulièrement confrontés à des problèmes de contaminations microbiologiques, majoritairement liés à la présence de *Legionella sp.* et/ou *P. aeruginosa*. Selon un rapport émanant des autorités sanitaires françaises et recensant les contaminations bactériennes ayant eu lieu dans les établissements thermaux, plus de 80 % d'entre eux ont subi une contamination microbiologique pendant la saison thermale 2001. Deux tiers d'entre elles étaient liées à la présence de *P. aeruginosa* (DGS, 2005). La persistance de ces contaminations dans les réseaux de distribution d'eau minérale naturelle est sanctionnée par une fermeture administrative du point d'usage concerné ou de la totalité de l'établissement thermal selon les cas. Ces fermetures ont un coût économique considérable pour l'établissement et l'économie locale associée à l'activité thermale. L'addition des pertes d'exploitation, de la compensation des patients et des coûts techniques liés aux analyses microbiologiques, à l'audit ou au conseil, peut atteindre plusieurs millions d'euros, soit une part significative du chiffre d'affaire annuel d'un établissement thermal.

Plusieurs paramètres propres au réseau de distribution dont sa conception et ses conditions d'exploitation peuvent favoriser l'implantation et le développement de *P. aeruginosa*. Le refroidissement de l'eau minérale provenant d'une source chaude par mélange avec la même eau minérale provenant d'une source froide a été identifié comme une des causes probables de contamination d'un réseau de distribution d'eau thermale. Les points d'usage ont été identifiés comme les points du réseau de distribution les plus vulnérables aux contaminations. Cette vulnérabilité a été attribuée à la présence d'appareils thermaux comprenant des éléments de robinetterie de conception complexe (Morin et Graber-Duvernay,

2002). Le contenu minéral des eaux est également suspecté d'influencer la formation de biofilm. Le biofilm n'augmente pas seulement la résistance des microorganismes qu'il héberge mais également leur persistance et peut agir comme réservoir d'éléments pathogènes (Wingender et Flemming, 2011). Il est à ce titre susceptible de libérer dans l'eau circulante des individus mobiles en concentration suffisante pour constituer une dose infectieuse (Roser *et al.*, 2013). Malgré son occurrence dans les réseaux de distribution d'eau thermique, le développement du biofilm de *P. aeruginosa* dans un environnement au contenu minéral complexe correspondant à celui des eaux minérales naturelles n'a jamais été décrit dans la littérature scientifique internationale.

Dans cette partie, l'influence de la composition minérale de trois eaux minérales naturelles a été testée sur la capacité de *P. aeruginosa* à former du biofilm. Trois eaux minérales naturelles embouteillées ont été choisies selon leur résidu sec à 180 °C pour modéliser différentes conditions de minéralisation naturelle qualifiées de faible, moyenne et forte. Leur influence a été investiguée sur la capacité de formation de biofilm d'un panel de souches de *P. aeruginosa* comprenant la souche de référence PAO1, sept souches environnementales isolées de réseaux de distribution d'eau potable et d'eau thermique et une souche d'origine clinique. Cette influence a été évaluée en conditions statiques à l'aide de la mesure (i) de la croissance planctonique (densité optique à 600 nm), (ii) de la formation globale de biofilm (marquage au cristal violet associé à la mesure de la densité optique à 570 nm) et (iii) de l'activité métabolique globale au sein des biofilms (ATPmètrie). L'effet de la minéralisation sur les charges de surface des cellules bactériennes a également été estimé à l'aide de la mesure du potentiel zêta.

II. Matériel et méthodes.

1. Souches et conditions de culture.

Les souches dont les caractéristiques sont détaillées dans le tableau 17 (partie 2. III.1) ont été cultivées en conditions aérobies suivant le protocole standardisé détaillé dans le partie 2. II.1. Les sous-cultures obtenues en milieu Luria Broth (LB) ont été utilisées pour ensemencher des milieux de culture minimum préparés dans les eaux minérales naturelles embouteillées.

2. Qualité de l'eau et caractérisation de l'interférence de la flore microbienne cultivable des eaux minérales naturelles sur les essais.

Les caractéristiques physicochimiques des eaux minérales naturelles utilisées sont détaillées dans le tableau 19 (partie 2. III.2). Les eaux minérales naturelles ne sont pas stériles et ne peuvent être stérilisées sans altération de leurs propriétés physicochimiques. Par conséquent, la flore autochtone cultivable de chacune des eaux minérales a été caractérisée par des analyses quantitatives et qualitatives. L'analyse quantitative de la flore autochtone cultivable des eaux minérales naturelles a été réalisée par la technique des ufc sur milieu R2A pour chacune des eaux, incubation une semaine à 22 °C et dénombrement. La valeur indiquée correspond à la moyenne de trois mesures. Les principaux morphotypes visibles ont été isolés et identifiés par microséquençage à l'aide des bases de données AB bacterial 500 ou Ribosomal Data Project (Laboratoire Inovalys-Nantes, France).

Pour attester de l'absence d'interférence de ces flores sur les différents essais menés dans cette étude, les eaux minérales naturelles ont été pasteurisées 2 h à 60 °C. A l'issue de la pasteurisation, la préservation de leur contenu minéral et la suppression de leur flore bactérienne cultivable ont été respectivement vérifiées par mesure de leur conductivité, en tant qu'indicateur global de la minéralisation, et par dénombrement sur milieu R2A après une semaine d'incubation à 22 °C. Pour chacune des souches de *P. aeruginosa*, la croissance planctonique, la formation de biofilm et le contenu en ATP des populations adhérentes ont été mesurés et comparés en présence et en absence de la flore autochtone de chacune des eaux minérales naturelles embouteillées.

3. Conditions de formation du biofilm et mesures de l'indice de croissance.

Les cultures de souches en LB ont été diluées de façon à obtenir une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de 0,1 en milieux M63 modifiés (M63 10X dilués dans les trois eaux minérales naturelles) et supplémentés à 0,5 % en acides casamines, à 0,2 % en glucose et à 1 mM en $MgCl_2$. Les essais de formation de biofilm ont été effectués en microplaque « Calgary Biofilm Device » disponible sous le nom MBEC Assay™ System (Innovotech, Canada). Les microplaques ont été inoculées à l'aide de 200 μ L de suspension de chacune des souches par puits (figure 16). Trois essais indépendants ont été réalisés, aboutissant à l'obtention de douze réplicats par condition expérimentale. Au moins deux puits contrôles ont été remplis avec du milieu stérile pour chacune des conditions de minéralisation. Après 24 h d'incubation à 30 °C et une homogénéisation orbitale de 30 s, la DO_{600nm} a été mesurée directement dans les puits à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN-infinite® 200 (Tecan, Suisse). Cette mesure correspond à l'indice de croissance (IC).

4. Suivi du développement du biofilm.

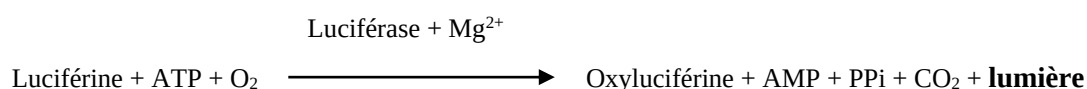
4.1 Marquage au cristal violet et mesures de l'indice de formation du biofilm.

Une fois la mesure de l'IC effectuée, une goutte de cristal violet (CV) 1 % a été ajoutée dans chacun des puits. Après incubation 15 min à température ambiante, le surnageant a été éliminé puis les microplaques ont été rincées trois fois à l'eau pour éliminer la coloration en excès. Dans chaque puits, 250 μ L d'éthanol dilué à 40 % ont été ajoutés pour dissoudre l'anneau de CV formé sur la surface des puits à l'interface air/liquide. Une fois la dissolution de l'anneau effectuée et après une homogénéisation orbitale de 30 s, la DO_{570nm} de chaque puits a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN-infinite® 200 (Tecan, Suisse) (figure 16). Cette mesure correspond à l'indice de formation de biofilm (IB). Douze réplicats par condition ont été effectués via trois essais indépendants.

4.2 Extraction de l'ATP et mesure de l'activité métabolique globale du biofilm.

Simultanément aux mesures de l'IB, l'indice d'activité métabolique globale du biofilm a été mesuré (IAMB). Cet indice correspond à la mesure de la concentration en ATP du biofilm de *P. aeruginosa* formé à la surface des peignes des microplaques dans des conditions de minéralisation spécifiques. L'activité globale du biofilm a été estimée via la mesure de l'ATP. Après 24 h d'incubation à 30 °C, les couvercles portant les peignes ont été désolidarisés du corps des microplaques et rincés en tampon phosphate (PBS pour Phosphate Buffer Saline) 1X avant d'être transférés dans des microplaques 96 puits blanches opaques contenant dans chaque puits 250 µL de réactifs du kit de test de viabilité BacTiter-Glo™ (Promega, USA) dilués au demi en eau déminéralisée. La formulation de ces réactifs permet l'extraction de l'ATP de cellules bactériennes. L'intensité du signal bioluminescent généré par une luciférase thermostable (équation 1) est proportionnelle à la quantité d'ATP présent. Les mesures de bioluminescence ont été effectuées à l'aide d'un lecteur de plaque TECAN-infinite® 200 (Tecan, Suisse) après 30 s d'homogénéisation orbitale (figure 16). Douze réplicats par condition ont été effectués via trois essais indépendants réalisés en deux campagnes d'essais. Les résultats obtenus, exprimés en unités relatives de lumière (RLU), ont été converti en concentration d'ATP (ng/mL) à l'aide d'une gamme étalon. Cette gamme a été réalisée à partir d'une suspension d'ATP concentrée à 2 mg/L et diluée en cascade au dixième. Les dilutions comprises entre 10^{-3} et 10^{-7} ont été retenues pour la construction de la gamme. Une gamme a été réalisée pour chacune des deux campagnes d'essais : la gamme de la première campagne comprenait 6 réplicats par points et celle de la deuxième campagne trois réplicats par points.

Équation 1 : Réaction de bioluminescence (PPi : phosphate inorganique).



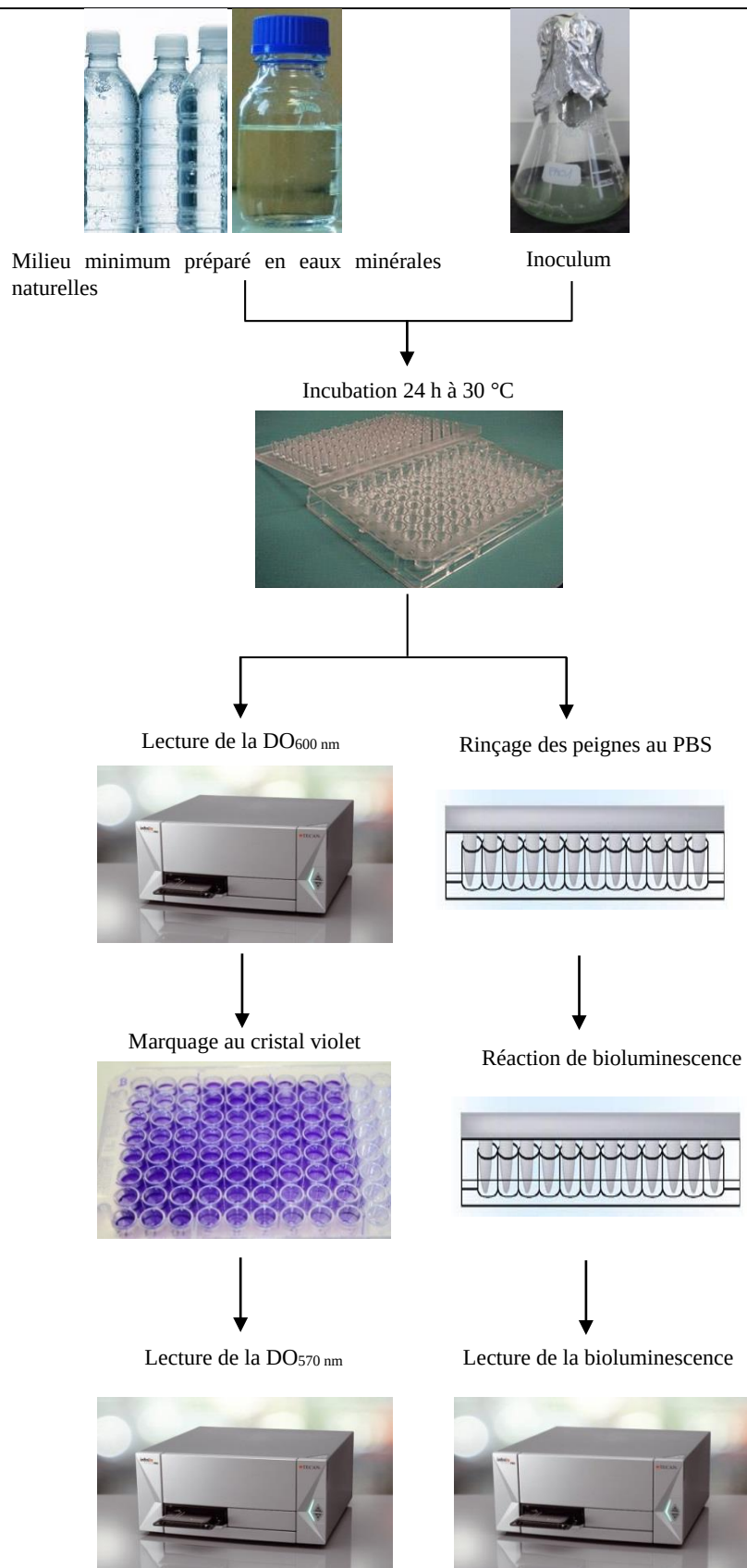


Figure 16 : Etapes du protocole de suivi de la formation du biofilm.

5. Charge de surface : mesure du potentiel zêta.

Les sous-cultures bactériennes standardisées ont été centrifugées 10 min à 7 000 g. Les surnageants ont été éliminés et les culots ont été rincés et suspendus dans 40 mL d'eau déminéralisée, faiblement, moyennement ou fortement minéralisée avant incubation 24 h à 37 °C. La charge globale de surface des cellules bactériennes a été évaluée par mesures du potentiel zêta des suspensions. Le potentiel zêta a été estimé par mesure de la mobilité électrophorétique par analyse d'images en temps réel à l'aide d'un système de micro-électrophorèse « Zetaphoremeter IV » (CAD instrumentations, France) (figure 17) et a été calculé sur la base de l'équation Helmholtz-Von Smoluchowski, considérée comme pertinente pour les particules larges telles que les bactéries et les virus (Wilson *et al.*, 2001). Le potentiel zêta des cellules bactériennes a été mesuré à température ambiante et au pH proche de la neutralité de chacune des eaux minérales (Partie 2. III.2 - tableau 19). Quatre mesures ont été effectuées à l'aide de deux essais indépendants pour chacune des souches. Le nombre de particules détectées était compris entre 20 et 350 par condition testée.



Figure 17 : Système de micro-electrophorèse « Zetaphoremeter IV » (CAD instrumentations, France).

6. Analyses statistiques.

L'absence d'interférence de la flore bactérienne autochtone des eaux minérales a été évaluée par comparaison des différents paramètres bactériens mesurés en eaux minérales pasteurisées et non pasteurisées à l'aide du test statistique non-paramétrique Mann-Withney. Les données d'IC et d'IB ont été soumises à une analyse de variance à deux paramètres (ANOVA) complétée par le test multi-comparatif de Newman-Keuls afin d'attester de l'influence de la diversité des souches et de la minéralisation sur la croissance bactérienne et la formation de biofilm. Les données d'IAMB ne suivant pas une distribution normale d'après le test de Shapiro-Wilks, ont été analysées par le test statistique non-paramétrique de Kruskal-Wallis complété par le test de Dunn. Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée pour établir l'existence de corrélations potentielles entre les différents paramètres mesurés. Le test de Kruskal-Wallis associé au test de Dunn a également été appliqué à l'analyse des mesures de potentiel zêta du fait de leur distribution non-normale. L'ensemble des tests statistiques a été effectué avec un niveau de significativité $\alpha=0,05$ en utilisant le logiciel XLSTAT 2012 (Addinsoft SARL, France).

III. Résultats.

1. Eaux minérales naturelles embouteillées : analyses de la flore bactérienne autochtone cultivable.

Des analyses quantitatives et qualitatives ont été effectuées sur la flore bactérienne autochtone des eaux minérales naturelles. Les souches cultivables identifiées dans chacune des eaux minérales par microséquençage sur l'ADN 16S sont présentées dans le tableau 21. Les sept isolats identifiés sont des bactéries à gram⁻ appartenant à la classe des β -protéobactéries et sont affiliés au clade des *Burkholderiales*. Les genres *Hydrogenophaga*, *Curvibacter* et *Acidovorax* font partis du sous-clade des *Comamonadaceae* tandis que le genre *Limnobacter* appartient au sous-clade des *Burkholderiaceae*.

Tableau 21 : Description des souches isolées dans chacune des eaux minérales naturelles testées.

Niveau de minéralisation	Espèces identifiées
Faible	<i>Hydrogenophaga palleronii</i> <i>Curvibacter</i> sp.
Moyen	<i>Acidovorax facilis</i> <i>Limnobacter</i> sp. non-identifiée
Fort	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> <i>Hydrogenophaga palleronii</i> <i>Curvibacter</i> sp.

Avant une comparaison approfondie de l'influence du contenu minéral des eaux sur les paramètres bactériens mesurés (croissance, formation de biofilm et activité métabolique du biofilm), l'interférence potentielle de leur microflore autochtone respective a été évaluée en triplicat pour chaque souche de *P. aeruginosa*. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par le test non paramétrique de Mann-Whitney entre les mesures effectuées en eaux minérales naturelles et celles effectuées dans ces mêmes eaux pasteurisées ($p=0,983$).

2. Mesure de la croissance planctonique : indice de croissance.

D'après les résultats de l'ANOVA, l'indice de croissance (IC) diffère significativement selon les souches ($p < 0,0001$). Le traitement supplémentaire des données par le test statistique de Newman-Keuls conduit à la classification des souches en différentes catégories (figure 18) basées sur la moyenne des indices de croissance toute minéralisation confondue (ICm). Ainsi, plus de la moitié des souches présentent un ICm supérieur à 0,3. Les souches D1 et PAO1 ont un ICm compris entre 0,2 et 0,3 tandis que les souches ST395P et ST111 sont les seules souches ayant un ICm inférieur à 0,2. Bien qu'elles soient isogéniques, les souches ST395P et ST395E n'appartiennent pas à la même catégorie d'ICm.

D'après le test ANOVA, le contenu minéral naturel des eaux a une influence significative sur la croissance des différentes souches ($p < 0,0001$) avec une croissance plus élevée en condition de minéralisation faible qu'en conditions de minéralisation moyenne et forte (figure 18)

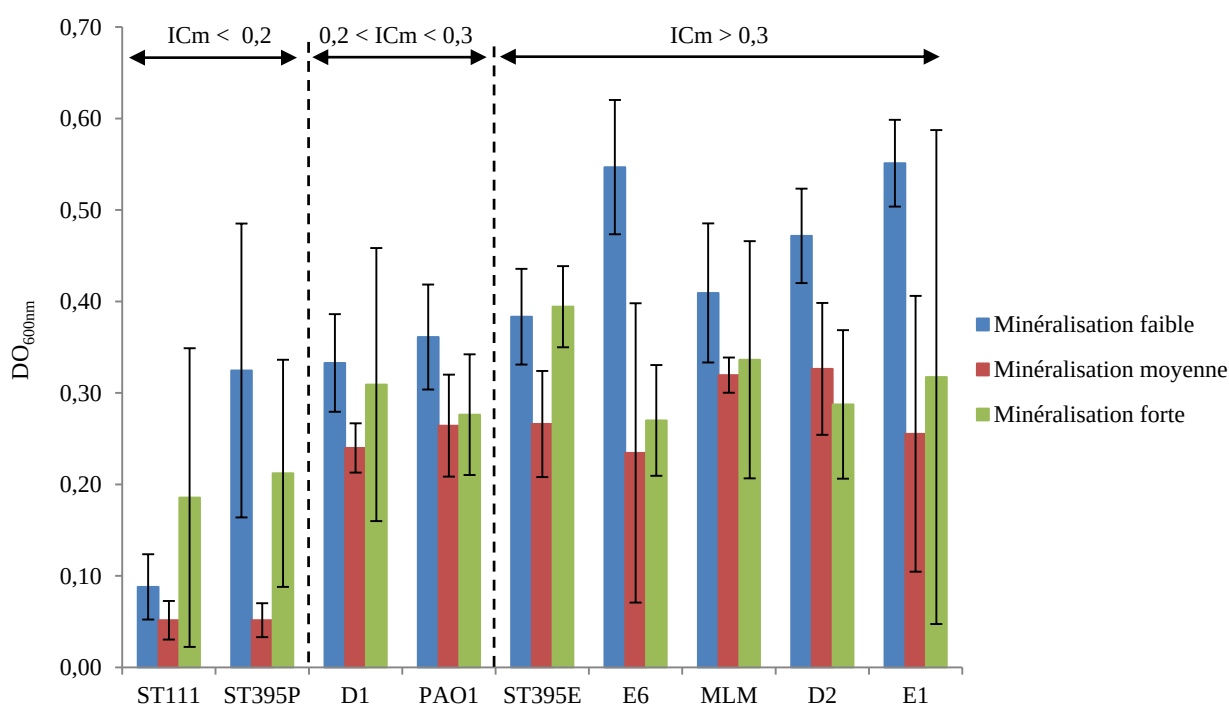


Figure 18 : Indice de croissance planctonique des souches de *P. aeruginosa*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. ICm correspond à la moyenne des indices de croissance toute minéralisation confondue.

3. Mesure du développement de biofilm : indice de formation globale de biofilm.

L'indice de formation globale de biofilm (IB) a été déterminé pour chacune des souches incubées en eau faiblement, moyennement ou fortement minéralisée par marquage au cristal violet et mesure de la DO_{570nm} associée. D'après les résultats du test ANOVA, dans cette étude l'IB est fortement dépendant de la souche considérée ($p < 0,0001$). Le traitement supplémentaire des données par le test statistique de Newman-Keuls conduit à une classification des souches en différentes catégories (figure 19) basées sur la moyenne des indices de formation globale de biofilm toute minéralisation confondue (IBm). La majorité des souches du panel, dont la souche de référence PAO1, a un IBm compris entre 2 et 3 tandis que la souche ST111 est la seule souche présentant un IBm supérieur à 3. Les souches MLM, ST395E et D2 appartiennent à la catégorie ayant un IBm inférieur à 2. Bien qu'elles soient isogéniques, les souches ST395P et ST395E ne font pas partie de la même catégorie d'IBm.

L'indice de formation globale de biofilm est également impacté par les conditions de minéralisation ($p < 0,0001$). Les niveaux de formation de biofilm sont significativement plus élevés en condition de minéralisation faible qu'en conditions de minéralisation moyenne et forte. Quelle que soit la souche considérée, plus le niveau de minéralisation augmente plus l'indice de formation globale de biofilm diminue (figure 19).

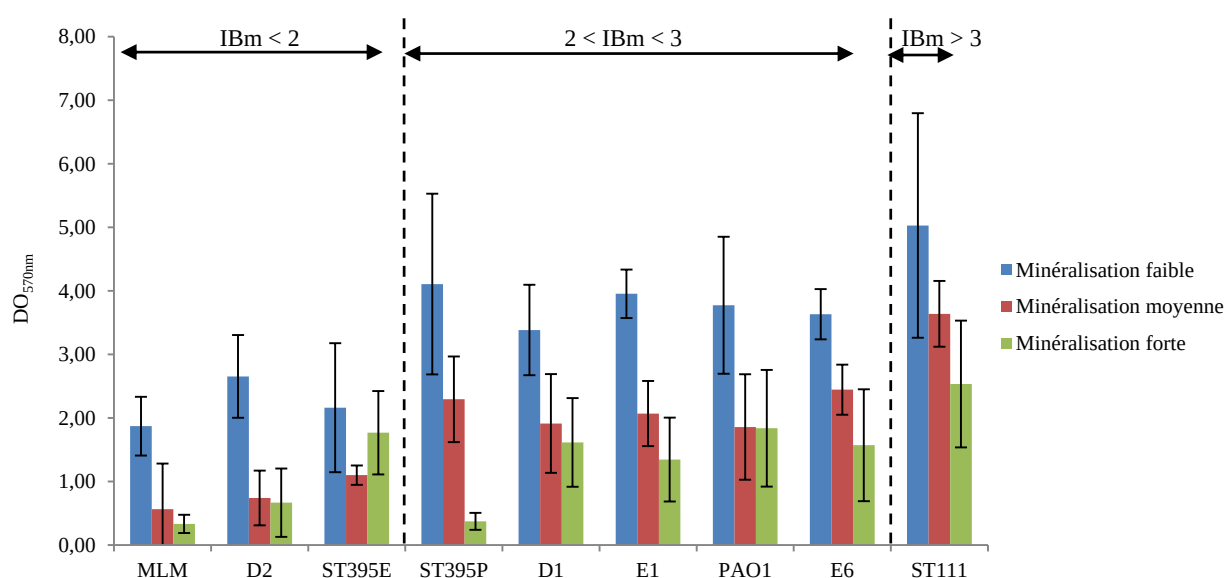


Figure 19 : Indice de formation globale de biofilm des souches de *P. aeruginosa*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. IBm correspond à la moyenne des mesures d'indices de formation globale de biofilm toute minéralisation confondue.

4. Mesure du développement du biofilm : indice de l'activité métabolique globale.

En parallèle des mesures de biofilm, l'indice de l'activité métabolique globale au sein des biofilms (IAMB) a été évalué par mesure de la concentration en ATP de la biomasse adhérente sur les peignes des couvercles des plaques. Les gammes d'ATP réalisées pour chacune des deux campagnes d'essais ont permis la conversion des RLU en concentration d'ATP (ng/mL) (figure 20).

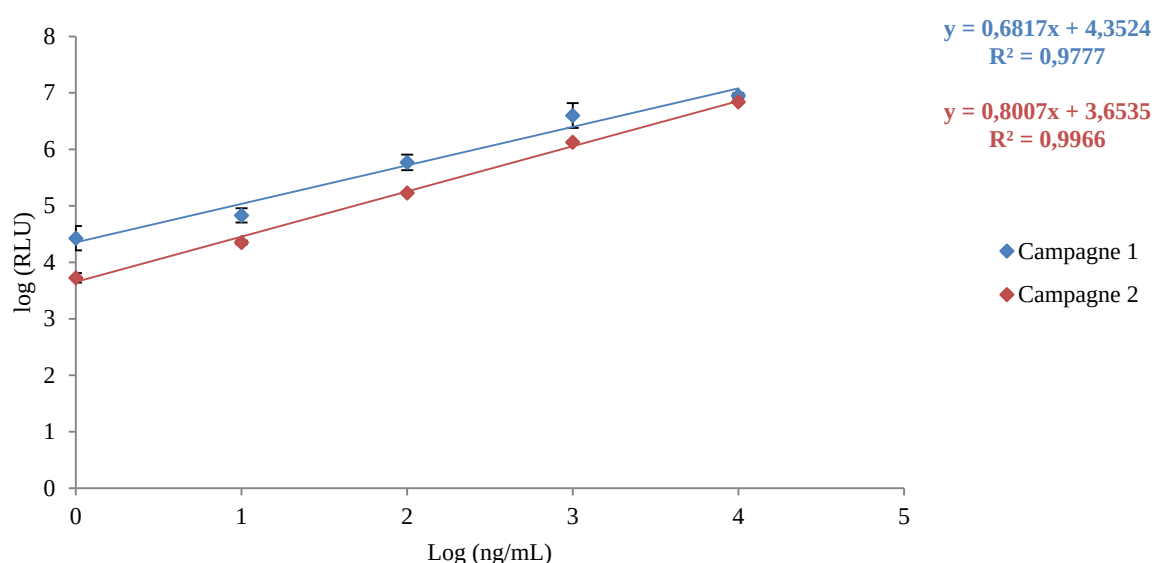


Figure 20 : Gammes étalon des deux campagnes d'essais de mesure de l'activité métabolique globale (RLU : unités relatives de lumière). Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.

L'analyse statistique de ces données de concentrations a mis en évidence des différences significatives d'activité métabolique, toute minéralisation confondue, entre les souches ($p < 0,0001$). Pour la majorité des souches l'IAMBm n'excède pas 700 ng d'ATP/mL. Seule la souche ST111 montre un profil spécifique avec des valeurs d'IAMBm supérieures à cette concentration (figure 21).

D'après le test statistique, le contenu minéral des eaux a une influence significative sur l'IAMBm ($p = 0,0001$) qui présente des valeurs plus fortes en condition de minéralisation faible qu'en conditions de minéralisation moyenne et forte. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les conditions de minéralisation moyenne et forte ($p = 0,670$).

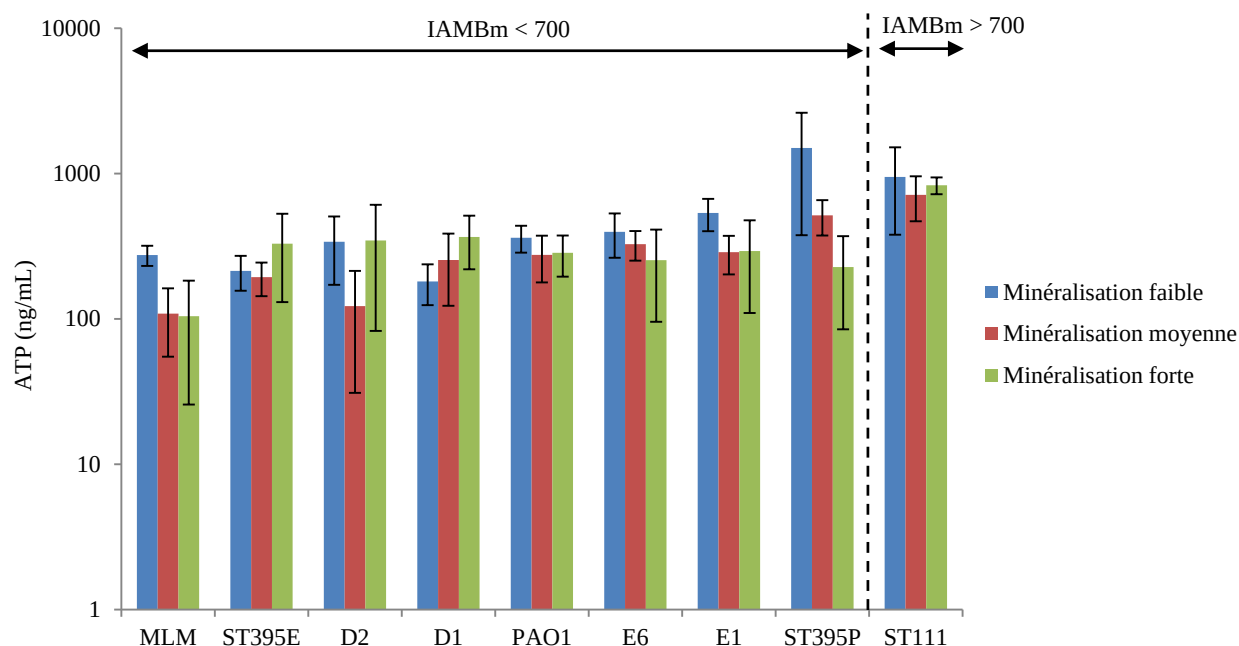


Figure 21 : Activité métabolique globale au sein du biofilm des souches de *P. aeruginosa*. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. IAMB correspond à l'activité métabolique globale au sein des biofilms d'une souche toute minéralisation confondue.

5. Liens entre le contenu minéral naturel des eaux et les paramètres bactériens mesurés : analyse en composantes principales.

Une analyse en composantes principales (ACP) incluant les caractéristiques physicochimiques des milieux M63 préparés dans les trois eaux minérales et prenant en compte les concentrations des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- et les paramètres bactériens mesurés (IC, IB et IAMB) a été effectuée. Les coefficients de corrélation entre les éléments testés proviennent de la matrice de corrélation de Pearson associée à l'ACP (tableau 22).

Les résultats de l'ACP montrent que l'IC et l'IB sont négativement corrélés avec les concentrations en Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- tandis que l'IAMB montre des corrélations négatives avec Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- et HCO_3^- . Les trois paramètres bactériens mesurés sont positivement corrélés avec les concentrations en Na^+ , K^+ et NO_3^- . La force des corrélations entre les caractéristiques physicochimiques des eaux et les paramètres bactériens est toujours plus importante pour l'IB.

Bien qu'aucune corrélation n'ait été observée entre l'IC et l'IB, une corrélation positive a été notée entre l'IB et l'IAMB et une corrélation négative entre l'IAMB et l'IC (tableau 22).

Tableau 22 : Matrice de corrélation de Pearson. Les valeurs inscrites en gras indiquent des facteurs de corrélations significativement différents de zéro entre les paramètres testés.

Variables	IC	IB	IAMB
IC	1	0,046	-0,228
IB	0,046	1	0,380
IAMB	-0,228	0,380	1
Ca ²⁺	-0,197	-0,551	-0,170
Mg ²⁺	-0,261	-0,590	-0,199
Na ⁺	0,348	0,611	0,231
K ⁺	0,418	0,558	0,244
Cl ⁻	-0,337	-0,611	-0,228
NO ₃ ⁻	0,421	0,548	0,243
SO ₄ ²⁻	-0,056	-0,428	-0,100
HCO ₃ ⁻	-0,373	-0,606	-0,238

6. Charge de surface des cellules bactériennes : mesure du potentiel zêta.

Suite à l'observation de comportements similaires entre d'une part les souches D2 et MLM et d'autre part les souches E1 et E6 (figures 15, 16 et 18), le panel étudié a été restreint à sept souches. Le terme neutralité utilisé ici désigne une charge de surface nulle. Toutes les souches de *P. aeruginosa* testées sont négativement chargées avec une variation de la valeur absolue de la charge de surface selon la souche concernée (tableau 23). La souche ST111 a un profil significativement différent des autres souches du panel avec un potentiel zêta proche de -12 mV tandis que celui des autres souches est compris entre -26 et -19 mV quelle que soit la condition de minéralisation considérée. Les souches isogéniques ST395P et ST395E ont montré des valeurs de potentiel zêta moyen similaires malgré des comportements différents pour l'IC et l'IB.

Le potentiel zêta est significativement influencé par le contenu minéral naturel des eaux ($p < 0,0001$) : plus le niveau de minéralisation est élevé plus la valeur absolue du potentiel zêta est faible. Aucune différence significative n'est observable entre les conditions de minéralisation moyenne et forte ($p = 0,117$). La souche ST111 montre un potentiel zêta hétérogène caractérisé par la cohabitation de deux sous-populations avec des valeurs de charge de surface différentes (figure 22). Cette hétérogénéité a été observée en conditions de minéralisation faible et forte (tableau 23) : en minéralisation faible une sous-population majoritaire avec un potentiel zêta de

-11mV est détectée simultanément à une sous-population minoritaire avec un potentiel zêta de -77mV. De la même façon, en minéralisation forte une sous-population majoritaire avec un potentiel zêta proche de -6 mV est détectée simultanément à une sous-population minoritaire avec un potentiel zêta proche de -53 mV.

Tableau 23 : Potentiel zêta moyen (mV) de sept souches de *P. aeruginosa* selon les conditions de minéralisation ($\pm$ écart-type).

Souches	Eau déminéralisée	Eau faiblement minéralisée	Eau moyennement minéralisée	Eau fortement minéralisée
MLM	-38,5 $\pm$ 1,7	-17,8 $\pm$ 2,9	-17,0 $\pm$ 0,6	-14,8 $\pm$ 1,8
ST395E	-38,2 $\pm$ 0,9	-18,8 $\pm$ 1,8	-16,3 $\pm$ 0,3	-14,7 $\pm$ 1,2
PAO1	-36,6 $\pm$ 0,9	-20,8 $\pm$ 3,6	-18,3 $\pm$ 0,6	-17,0 $\pm$ 1,0
D1	-44,6 $\pm$ 0,3	-23,2 $\pm$ 0,4	-17,9 $\pm$ 0,4	-15,9 $\pm$ 0,4
E1	-39,0 $\pm$ 3,0	-24,1 $\pm$ 2,7	-13,3 $\pm$ 2,2	-15,6 $\pm$ 0,5
ST395P	-30,0 $\pm$ 0,5	-25,2 $\pm$ 2,4	-15,2 $\pm$ 3,5	-11,9 $\pm$ 1,0
ST111	-33,3 $\pm$ 1,3 ^(a)	-13,6 $\pm$ 2,1 ^(a)	-6,8 $\pm$ 0,8 ^(a)	-6,3 $\pm$ 1,9 ^(a)
	nd	-10,8 $\pm$ 1,4 ^(b)	nd	-5,7 $\pm$ 0,5 ^(b)
	nd	-77,6 $\pm$ 8,9 ^(c)	nd	-53,4 $\pm$ 2,8 ^(c)

Nd : pas de détection de potentiel zêta hétérogène pour la souche ST111 dans ces conditions de minéralisation.

- (a) Population de ST111 avec un potentiel zêta homogène (100 % des particules détectées).
- (b) Population de ST111 avec un potentiel zêta hétérogène : sous-population avec une charge de surface proche de la neutralité (environ 70 % des particules détectées).
- (c) Population de ST111 avec un potentiel zêta hétérogène : sous-population avec une charge de surface fortement négative (environ 30 % des particules détectées).

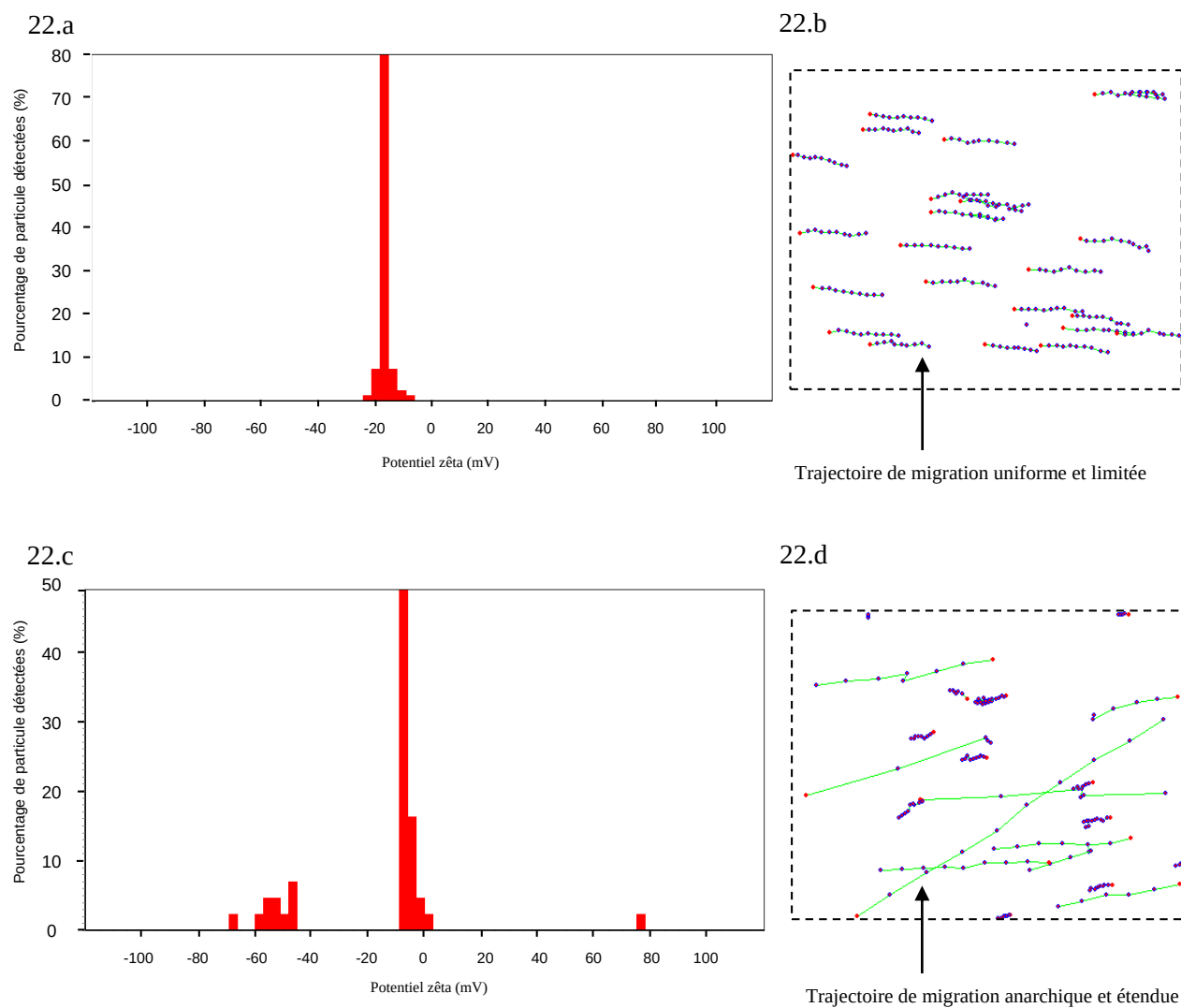


Figure 22 : Potentiel zêta des souches PAO1 et ST111 en condition de minéralisation forte. Distribution du nombre de cellules bactériennes selon leur potentiel zêta (22.a : PAO1 et 22.c : ST111). Trajectoires de migration des cellules bactériennes (22.b : PAO1 et 22.d : ST111).

IV. Discussion.

L'absence de données scientifiques concernant l'implantation de *P. aeruginosa* dans des conditions de minéralisation complexes propres aux eaux thermales ne permet pas d'identifier de façon formelle les facteurs susceptibles de favoriser la formation de biofilm par cette bactérie. Cependant, les quelques informations disponibles dans les réseaux de distribution d'eau thermique et les nombreuses études concernant les réseaux de distribution d'eau potable permettent de formuler quelques hypothèses. La qualité de l'eau circulante, la nature et l'état de surface des matériaux constitutifs du réseau de distribution ou le niveau de complexité des équipements thermaux peuvent être raisonnablement suspectés comme des facteurs impactant le comportement de *P. aeruginosa*. Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses, l'influence de la qualité d'eaux minérales naturelles, et plus particulièrement de leur composition minérale, a été étudiée sur la capacité de *P. aeruginosa* à former du biofilm.

Préalablement à toute mesure, la flore bactérienne autochtone des différentes eaux minérales a été identifiée. Pour chacune d'entre elle, au moins deux espèces cultivables prédominantes ont pu être isolées et identifiées comme appartenant à la classe des β -protéobactéries, classe la plus communément identifiée dans les eaux minérales naturelles avec les α -protéobactéries et les γ -protéobactéries (Falcone-Dias *et al.*, 2012). Les tests menés dans cette partie ont montré que la présence ou l'absence de ces espèces n'a pas d'impact sur les différents paramètres biologiques mesurés pour suivre l'implantation de *P. aeruginosa*. Aucune d'entre elles ne semblant montrer une action antagoniste ou synergique susceptible d'influencer le comportement de la bactérie d'intérêt, les eaux minérales naturelles non pasteurisées ont été utilisées pour la suite de l'étude.

En absence d'interférence liée à la flore autochtone, l'implantation de *P. aeruginosa* répond à des comportements hétérogènes dépendants de la souche considérée. Bien que sa croissance planctonique soit faible, la souche ST111 possède la capacité de formation de biofilm la plus élevée et l'activité métabolique globale la plus forte au sein du panel de souches testé, associées à une charge de surface hétérogène. Bien qu'elles soient isogéniques, les souches ST395P et ST395E montrent des capacités de croissance et de formation de biofilm opposées mais des charges globales de surface similaires. Ces divergences peuvent être mises sur le compte de leur contenu génomique et micro-génomique distinct récemment décrit par Luccheti-Miganeh *et al.* (2014). Les souches D1 et D2, toutes deux isolées d'eau thermique, montrent des capacités de croissance et de formation de biofilms différentes mais une activité

métabolique globale similaire. A l'inverse, les souches E1 et E6, isolées respectivement d'eau potable (réseau de rinçage) et d'eau thermale (poste de soins) et présentant des codes MLVA similaires, se développent et forment du biofilm à des niveaux identiques et présentent une activité métabolique similaire. Ces résultats suggèrent qu'un comportement observé pour une souche ne peut être généralisé à l'espèce et que la diversité de croissance planctonique et de formation de biofilm peut être due à une diversité génétique naturelle ou à des pressions de sélection liées à l'environnement. Cette diversité de comportements a déjà été décrite pour le développement de biofilm de souches de *P. aeruginosa* de différentes origines cliniques (Nagant *et al.*, 2010 ; Sanchez *et al.*, 2013).

Tout en prenant en compte les apports en ions provenant du milieu minimum M63, une influence significative du contenu minéral naturel des eaux utilisées a été observée sur le développement de *P. aeruginosa*. Les paramètres biologiques mesurés (IC, IB et dans une moindre mesure l'IAMB) sont corrélés négativement avec les concentrations en Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- et HCO_3^- . Néanmoins, des corrélations positives ont pu être observées entre ces paramètres et les concentrations en Na^+ , K^+ et NO_3^- , soulignant l'action spécifique de certains ions dans la croissance et la capacité de formation de biofilm de *P. aeruginosa*. L'influence de la minéralisation sur la formation de biofilm est similaire à celle sur la concentration en ATP des populations de *P. aeruginosa* adhérees à la surface des peignes. L'activité métabolique globale ne peut être reliée directement à un nombre de cellules en raison de la non-uniformité de la concentration en ATP des cellules bactériennes. La concentration en ATP intracellulaire des cellules bactériennes est fortement dépendante de leur état métabolique, ce dernier étant particulièrement hétérogène dans un contexte tel que celui du biofilm (Hammes *et al.*, 2010). D'autre part, cet indicateur global de l'activité métabolique n'est pas assez précis dans ces conditions expérimentales pour déterminer si la minéralisation influence la taille ou l'activité de la population adhéree formant le biofilm ou agit sur une voie biologique particulière. L'influence de la minéralisation par l'intermédiaire des ions est donc suspectée d'agir à différents niveaux. Elle peut ainsi agir sur des mécanismes passifs, telles que les interactions physicochimiques induites entre les ions et la surface bactérienne, ou sur des mécanismes actifs tels que l'induction de voies de biosynthèses spécifiques.

Concernant les mécanismes passifs, il est considéré que la charge de surface des cellules bactériennes joue un rôle significatif dans les premières étapes de leur adhésion à une surface, adhésion décrite par la théorie de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO). Cette théorie résume les interactions totales induites entre une surface et une bactérie à la somme des forces

de van der Waals et des interactions électrostatiques. En suspension, les bactéries ont généralement une charge de surface négative à pH neutre due à l'état d'ionisation des composants de leur paroi cellulaire tels que des groupements carboxyles ou phosphates (Habimana *et al.*, 2014). La valeur de la charge de surface bactérienne dépend de l'espèce ou de la souche considérée (Goulter *et al.*, 2009) et peut être influencée par la sécrétion d'exopolymères (Tsuneda *et al.*, 2004 ; Planchon *et al.*, 2013) ou par les forces ioniques inhérentes au milieu (Kumar et Ting, 2013 ; Harimawan *et al.*, 2011). Toutes les souches testées ont une charge de surface globale négative avec un potentiel zêta moyen compris entre -26 mV et -19 mV, excepté pour la souche ST111 qui présente un potentiel zêta moyen proche de -12 mV. Leur charge de surface globale décroît avec l'augmentation de la force ionique du milieu. Il est communément accepté que, dans des conditions de forces ioniques élevées, l'importante adsorption des cations à la surface des cellules chargées négativement conduit à une réduction des forces de répulsions et de la barrière énergétique favorisant ainsi l'adhésion. A l'inverse, l'adsorption réduite de cations dans des conditions de forces ioniques faibles conserve les forces de répulsion et la barrière énergétique initiales ne favorisant pas l'adhésion (Hori et Mastumoto, 2010). Les ions adsorbés à la surface des cellules peuvent également avoir un effet inverse sur l'adhésion en masquant des éléments impliqués dans l'adhésion de la bactérie à une surface. Les interactions passives entre les ions et la surface des cellules bactériennes ne sont pas suffisantes pour expliquer la divergence des profils de formation de biofilm obtenus selon les conditions de minéralisation.

L'hétérogénéité de la charge de surface globale observée pour la souche ST111 en conditions de minéralisation faible et forte peut relever de mécanismes actifs contribuant aux capacités de la souche à former du biofilm. Cette hétérogénéité de potentiel zêta peut être la conséquence d'une expression hétérogène de polymères à la surface des bactéries. En effet, une hétérogénéité de potentiel zêta a été rapportée dans la littérature scientifique pour l'espèce *Enterococcus faecalis* (Van Merode *et al.*, 2006). Elle a pu être reliée à une surexpression des pili des sous-populations les plus fortement chargées négativement et corrélée à des capacités de formation de biofilm élevées (Tariq *et al.*, 2012). Dans le cas de *P. aeruginosa*, ces relations nécessitent d'être caractérisées à l'échelle de la sous-population.

Certains ions typiques des eaux minérales naturelles et plus spécifiquement Ca^{2+} et Mg^{2+} , ont été identifiés comme des signaux environnementaux modulant la formation de biofilm. Guraguain *et al.* (2013) ont démontré que l'homéostasie du calcium joue un rôle clé dans la mobilité de type « swarming » chez *P. aeruginosa* et ont identifié certains des

mécanismes et des protéines requis pour le maintien de cette homéostasie. Patrauchan *et al.* (2007) ont montré qu'une concentration en Ca^{2+} de 10 mM favorise la production de biofilm de la souche mucoïde FRD1 et de la souche de référence non-mucoïde PAO1 en stimulant la production d'alginate, la sécrétion de protéines extracellulaires et d'autres éléments non-identifiés. D'autre part, Mulcahy et Lewenza (2011) ont rapporté que la limitation en Mg^{2+} agit comme un signal environnemental qui stimule le développement de biofilm de *P. aeruginosa* via l'inactivation du répresseur de formation de biofilm RetS. L'analyse en composantes principales a montré ici que plus les concentrations en Ca^{2+} et en Mg^{2+} sont élevées plus la formation de biofilm est faible ce qui est en désaccord avec les observations faites par Patrauchan *et al.* (2007) mais en accord avec les constations de Mulcahy et Lewenza (2011). Il est important de souligner que ces deux études ont été menées dans des milieux de cultures supplémentés avec un unique ion apporté en concentration contrôlée. Dans ces conditions, les actions synergiques ou antagonistes pouvant avoir lieu entre les ions dans des milieux à la minéralisation complexe, tels que les eaux minérales naturelles, ne peuvent être observées. De plus l'importance des contre-ions n'a pas été étudiée. Dans les eaux minérales naturelles des anions, tels que NO_3^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- , peuvent agir comme agents chélateurs d'éléments indispensables à la formation de biofilm tel que le fer. Les différences de pigmentation arborées par certaines souches dans les trois conditions de minéralisation contenant des concentrations en fer total identiques révèlent des différences de production de pigments. Cette pigmentation est suspectée d'interférer avec les mesures de biomasse planctonique basées sur la densité optique, phénomène notamment rapporté pour des microalgues (Griffiths *et al.*, 2011). Cette interférence peut masquer la corrélation attendue entre la croissance planctonique et les capacités de formation de biofilm, corrélation précédemment décrite dans le cas de *Pseudomonas fluorescens* (Sommer *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus dans cette partie montrent que les souches de *P. aeruginosa* étudiées ici ne présentent pas les mêmes capacités de formation de biofilm : la souche environnementale ST111 isolée d'eau potable a été identifiée comme fortement productrice de biofilm. Une influence de la minéralisation sur ses capacités de formation de biofilm a également été mise en évidence avec une formation favorisée en eau faiblement minéralisée, défavorisée en eau moyennement minéralisée et fortement défavorisée en eau fortement minéralisée. L'effet de la minéralisation sur la charge de surface globale des cellules bactériennes ne suffit pas à expliquer les différences de formation de biofilm observées et suggère l'implication de mécanismes actifs dépendants de l'activité bactérienne.

Quatrième partie :
Influence de la minéralisation sur les
principaux mécanismes bactériens
impliqués dans la formation du biofilm de
***P. aeruginosa*.**

I. Introduction.

La formation de biofilm est communément décrite comme un processus séquentiel basé sur un modèle de développement comprenant des étapes d'adhésion, de maturation et de dispersion (Costerton *et al.*, 1995). Dans un premier temps relativement court, l'adhésion est principalement régie par des interactions physiques et chimiques telles que des interactions électrostatiques ou des forces hydrophobes avant l'intervention, dans un second temps, de mécanismes biologiques. L'étape d'adhésion précoce, appelée adhésion réversible, est caractérisée par l'établissement d'interactions transitoires entre la bactérie et la surface, supportées pour partie par des comportements de mobilité spécifique, le tout contribuant à l'exploration des surfaces rencontrées (Conrad, 2012). La synthèse d'exopolymères est induite par ces contacts entre bactérie et surface et conduit au passage de l'adhésion réversible à l'adhésion irréversible. En effet, les exopolymères, dont les exopolysaccharides, agissent comme des composés adhésifs renforçant l'attachement des cellules bactériennes (Wei et Ma, 2013). L'augmentation de la synthèse d'exopolymères contribue au développement de la matrice extracellulaire dont l'expansion aboutit à l'inclusion des macrocolonies formées par multiplication des bactéries initialement présentes. L'ensemble de ces éléments adopte une organisation stratifiée et acquiert une structure tridimensionnelle complexe au cours de la maturation du biofilm (Barken *et al.*, 2008). L'étape de développement final du cycle est la phase de dispersion caractérisée par la libération d'individus mobiles capables de coloniser de nouvelles surfaces (Kaplan, 2010).

Le développement de biofilm peut également être supporté par des mécanismes bactériens initialement impliqués dans la virulence. *P. aeruginosa* a la faculté de produire des pigments bactériens, dont un sidérophore, la pyoverdine, et une phénazine, la pyocyanine, qui, en plus de lui conférer une coloration vert-jaune considérée comme typique de l'espèce, possèdent plusieurs fonctions. La pyoverdine est définie comme un composé diffusible impliqué dans la capture et le transport du fer notamment grâce à une forte affinité ($K_f \approx 10^{30} \text{ M}^{-1}$) pour cet élément (Schalk *et al.*, 2011). La pyoverdine joue également un rôle dans la virulence et la communication intercellulaire chez *P. aeruginosa* (Beare *et al.*, 2003). La pyocyanine est quant à elle décrite comme un métabolite secondaire de couleur bleu-vert présentant des propriétés redox liées à sa nature de donneur/accepteur d'électrons. La pyocyanine est initialement impliquée dans la génération de stress oxydatif par la production d'espèces réactives de l'oxygène (Dietrich *et al.*, 2006). Un rôle dans l'acquisition du fer a

récemment été attribué aux phénazines, et dans une moindre mesure à la pyocyanine, du fait de leur capacité à réduire, par transfert d'électron dans le milieu extracellulaire, Fe^{3+} sous sa forme Fe^{2+} biologiquement disponible (Wang *et al.*, 2011).

L'influence de la qualité des eaux minérales naturelles sur les capacités de formation de biofilm de 24 h de *P. aeruginosa* a été étudiée dans la partie 3. Les interactions passives induites entre la surface et les cellules bactériennes n'ont pas été retenues comme un facteur clé dans cet effet, bien que la charge globale de surface des cellules bactériennes soit influencée par la minéralisation. Cette partie se concentre donc sur l'évaluation de l'impact de la minéralisation sur les trois mécanismes bactériens connus comme étant impliqués dans les premières étapes de formation du biofilm de *P. aeruginosa*. L'effet du contenu minéral de trois eaux minérales naturelles a ainsi été testé (i) sur les trois principaux types de mobilité possédés par *P. aeruginosa*, soient le « swarming », le « swimming » et le « twitching », supportés par les pili de type IV et un flagelle fonctionnel (Conrad, 2012), (ii) sur la synthèse des trois exopolysaccharides produits par *P. aeruginosa*, l'alginate étant majoritairement produit par les souches cliniques et le Pel (Pellicle locus) et le Psl (Pseudomonas synthesis locus) par les souches environnementales (Friedman et Kolter, 2004) et (iii) sur la production de la pyoverdine et de la pyocyanine, deux pigments bactériens agissant comme facteurs de virulence. Ces paramètres biologiques ont été mesurés pour neuf souches d'origine clinique, environnementale ou thermale.

II. Matériel et méthodes.

1. Souches, conditions de culture et qualité des eaux minérales naturelles utilisées.

Voir Partie 2 II.1 et 2, III.1 – tableau 17 et III.2 – tableau 19.

2. Evaluation des capacités de mobilité.

2.1 Mobilité de type « swarming ».

Les essais d'évaluation des capacités de mobilité de type « swarming » ont été effectués dans trois conditions de minéralisation. Un milieu de base concentré à 5X (64,0 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15,0 g de KH_2PO_4 , 2,5 g de NaCl et 2,5 % d'agar pour 1 L d'eau déminéralisée) a été dilué cinq fois en eau faiblement, moyennement ou fortement minéralisée, préalablement préchauffée 2 h à 60 °C de façon à éliminer leur flore autochtone, et a été supplémenté en glucose à 0,2 %, en acides casamines à 0,5 % et en MgSO_4 1 mM (Caiazza *et al.*, 2007). Les boîtes de Pétri ont été remplies de 20 mL de milieu et séchées à l'air libre en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique avant leur utilisation. L'inoculation a été effectuée par dépôt au centre de la boîte de 2,5 μL d'une culture de *P. aeruginosa* en LB. Après 24 h d'incubation à 37 °C, le diamètre de la zone de migration a été mesuré à sa section la plus large. Trois réplicats biologiques indépendants ont été réalisés par condition testée.

2.2 Mobilité de type « swimming ».

Les essais d'évaluation des capacités de mobilité de type « swimming » ont été effectués dans trois conditions de minéralisation. Un milieu de base concentré à 5X (50 g de peptone, 25 g de NaCl et agar à 1,5 % pour 1 L d'eau déminéralisée) a été dilué cinq fois dans les eaux faiblement, moyennement ou fortement minéralisées, préalablement préchauffées 2 h à 60 °C de façon à éliminer leur flore autochtone, et a été supplémenté en glucose à 0,2 % (Mulet *et al.*, 2013). Les boîtes de Pétri ont été remplies de 20 mL de milieu et séchées à l'air libre en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique avant leur utilisation. Pour chacune des souches, une colonie a été inoculée au centre de la boîte avec un cure-dent stérile. Après 24 h d'incubation à 30 °C, le diamètre de la zone de migration a été mesuré à sa section la plus large. Trois réplicats biologiques indépendants ont été réalisés par condition testée.

2.3 Mobilité de type « twitching ».

Les essais d'évaluation des capacités de mobilité de type « twitching » ont été effectués dans trois conditions de minéralisation. Un milieu de base concentré à 5X (125 g de LB et agar à 5 % pour 1 L d'eau déminéralisée) a été dilué cinq fois en eau faiblement, moyennement ou fortement minéralisée préalablement préchauffée 2 h à 60 °C de façon à éliminer leur flore autochtone. Les boîtes de Pétri ont été remplies de 20 mL de milieu et séchées à l'air libre en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique avant leur utilisation. Pour chacune des souches, une colonie a été inoculée à travers la gélose à l'aide d'un cure-dent stérile. Après 24 h d'incubation à 37 °C, la gélose a été délicatement retirée pour rendre accessible le halo transparent correspondant à la zone de migration et permettre le marquage au cristal violet pendant 30 s à température ambiante. L'excès de coloration a été rincé à l'eau et le diamètre de la zone de marquage a été mesuré à sa section la plus large. Trois réplicats biologiques indépendants ont été réalisés par condition testée.

3. Synthèse d'exopolysaccharides.

3.1 Synthèse globale : test rouge congo.

Le test rouge congo a été réalisé dans trois conditions de minéralisation à partir d'un milieu de base concentré à 5X (bactotryptone à 5 % et agar à 5 % pour 1 L d'eau déminéralisée) dilué cinq fois en eau faiblement, moyennement ou fortement minéralisée préalablement préchauffée 2 h à 60 °C de façon à éliminer leur microflore autochtone. Du rouge congo concentré à 0,4 mg/L et du bleu de coomassie concentré à 0,2 mg/L ont été ajoutés dans le milieu avant d'en couler 1 mL dans chacun des puits d'une microplaque 24 puits. Après séchage, pour chacune des souches, 2,5 µL de culture de *P. aeruginosa* en LB ont été déposés au centre de la gélose avant 48 h d'incubation à 30 °C. Trois réplicats biologiques indépendants ont été réalisés par condition testée.

3.2 Expression des gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides : extraction d'ARN et qRT-PCR.

Des milieux M63 basés sur la dilution de M63 10X (20 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 30 g de KH_2PO_4 and 70 g de K_2HPO_4 pour 1 L d'eau déminéralisée) en eau faiblement, fortement ou moyennement minéralisée et supplémentés à 0,5 % en acides casamines, à 0,2 % en glucose et à 1 mM en MgCl_2 ont été inoculés à $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,1 à partir d'une culture en LB obtenue après incubation pendant une nuit à 37 °C des souches ST111, D1 et E1. Pour chacune des conditions

expérimentales, la phase de croissance exponentielle des différentes cultures a été atteinte après 7 h d'incubation à 37 °C. Après centrifugation des cultures et élimination du surnageant, les culots ont été congelés à l'azote liquide avant d'être conservés à -80 °C. Pour chacun des culots, l'ARN a été extrait selon les instructions du protocole du kit d'extraction (Promega, USA) en conditions exemptes de RNase. La concentration et l'intégrité de l'ARN extrait ont été respectivement vérifiées par mesure à l'aide d'un NanoDrop (Thermo Scientific, USA) et migration sur gel d'agarose. Une étape supplémentaire de purification et de concentration de l'ARN extrait a été effectuée si nécessaire à l'aide du kit RNeasy® mini kit (Qiagen, Norvège). Une qRT-PCR a été réalisée en deux étapes sur les échantillons d'ARN : pour chaque échantillon, 2 µg d'ARN ont été mélangés à 50 ng d'amorces de séquence aléatoire sous forme d'hexamères, 1 µL de dNTP à 10 mM, 2 µL de DTT à 0,10 M et 1 µL de reverse transcriptase superscript III. La transcription inverse a été réalisée par des étapes successives d'incubation de 10 min à 25 °C, 50 min à 50 °C et 5 min à 85 °C. L'élimination des dernières traces d'ARN a été garantie par l'ajout de RNase H et une étape d'incubation finale de 20 min à 37 °C. Les produits obtenus à l'issue de la transcription inverse ont été amplifiés par PCR quantitative en utilisant de l'ADN ribosomal 16S comme gène de référence.

4. Facteurs de virulence : mesure de la production de pyoverdine et de pyocyanine.

Des cultures de *P. aeruginosa* incubées pendant la nuit à 37 °C en milieu LB ont été diluées à DO_{600nm} 0,1 dans 10 mL de milieu minimum M63 préparé comme décrit ci-dessus en 3.2. La concentration en fer total des milieux M63 modifiés a été évaluée à 310 µg/L par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) suivant la norme NF EN ISO 17294-2 (T90-164) (Inovalys-Nantes laboratory, France). Après 24 h d'incubation à 37 °C, les cultures ont été centrifugées 10 min à 7 000 g puis les surnageants ont été filtrés à l'aide d'un filtre seringue 0,2 µm. L'élimination des bactéries a été vérifiée par étalement de 0,1 mL de surnageant sur milieu sélectif incubé 24 h à 37 °C. Les surnageants filtrés ont été analysés par spectrophotométrie UV-visible (UVIKON XS, SECOMAM, France). Les valeurs d'absorbances mesurées à 400 nm et à 691 nm, correspondant respectivement à la longueur d'onde d'absorbance maximale de la pyoverdine (Meyer *et al.*, 1978) et de la pyocyanine (Das et Manefield, 2012), ont été relevées.

5. Analyses statistiques.

D'après le test de Shapiro-Wilks, les données obtenues ne suivaient pas une distribution normale. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a donc été appliqué et complété par le test de Dunn pour déterminer la significativité de l'influence de la minéralisation et de l'effet de la diversité des souches. Une analyse en composantes principales a été effectuée dans le but d'étudier les corrélations entre le contenu minéral naturel des eaux testées et la production de pyoverdine ou de pyocyanine. Tous les tests statistiques ont été réalisés avec un niveau de significativité α de 0,05 à l'aide du logiciel XLSTAT 2012 (Addinsoft SARL, France).

III. Résultats.

1. Capacités de mobilité.

Bien que le test non paramétrique utilisé pour l'analyse statistique ne soit pas assez puissant pour proposer une classification des souches selon la taille de leur zone de migration, illustrée en figure 23, un comportement souche dépendant ($p < 0,0001$) a pu être observé (figure 24). Les souches ST111 et ST395P présentent des capacités de mobilités restreintes : la taille de leur zone de migration est inférieure à 1 cm quel que soit le type de mobilité considéré (figure 24). A l'inverse la souche de référence PAO1 et les souches E1 et E6 présentent des capacités de mobilité élevée : la taille de leur zone de migration est supérieure ou égale à 2 cm pour les trois types de mobilité testés. Les souches isogéniques ST395P et ST395E présentent des capacités de mobilité réduites, excepté pour la mobilité de type « swarming ». De la même façon, les souches d'origine thermale D1 et D2 présentent des capacités de mobilité similaires.

Aucun impact significatif de la minéralisation n'a pu être observé sur la mobilité de type « swarming » ($p=0,072$), « swimming » ($p=0,879$) ou « twitching » ($p=0,101$) (figure 24).

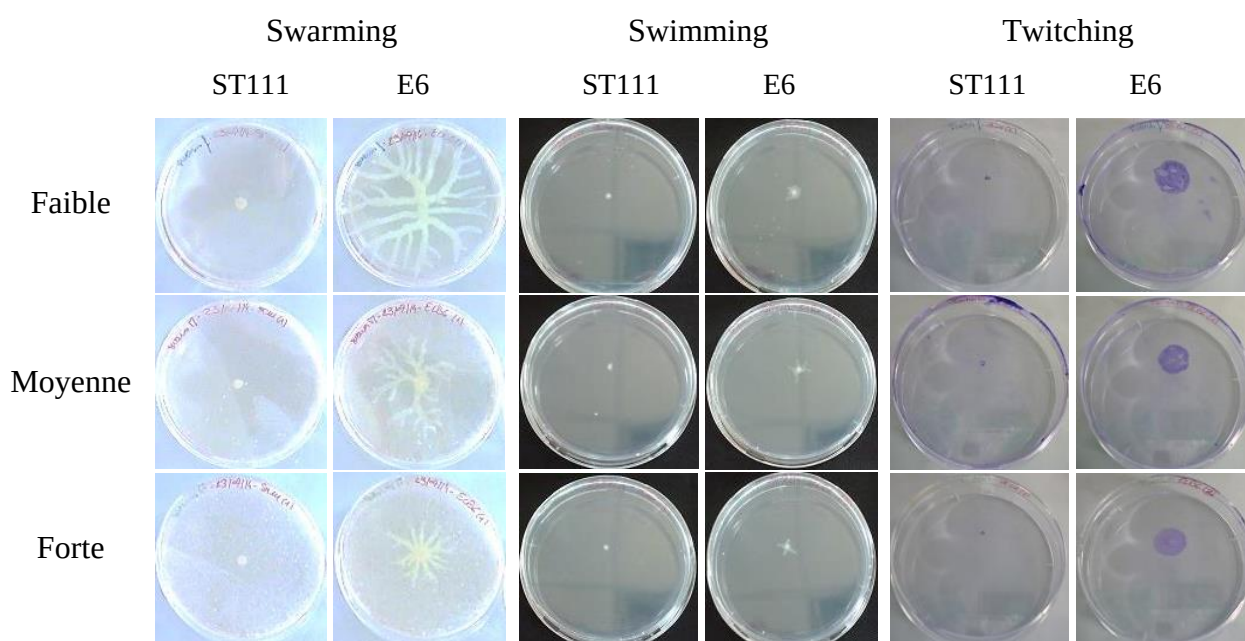


Figure 23 : Zone de migration des souches ST111 et E6 présentant des capacités de mobilité opposées selon d'une part le type de mobilité, indiqué en haut de la figure, et d'autre part la condition de minéralisation spécifiée à gauche de la figure.

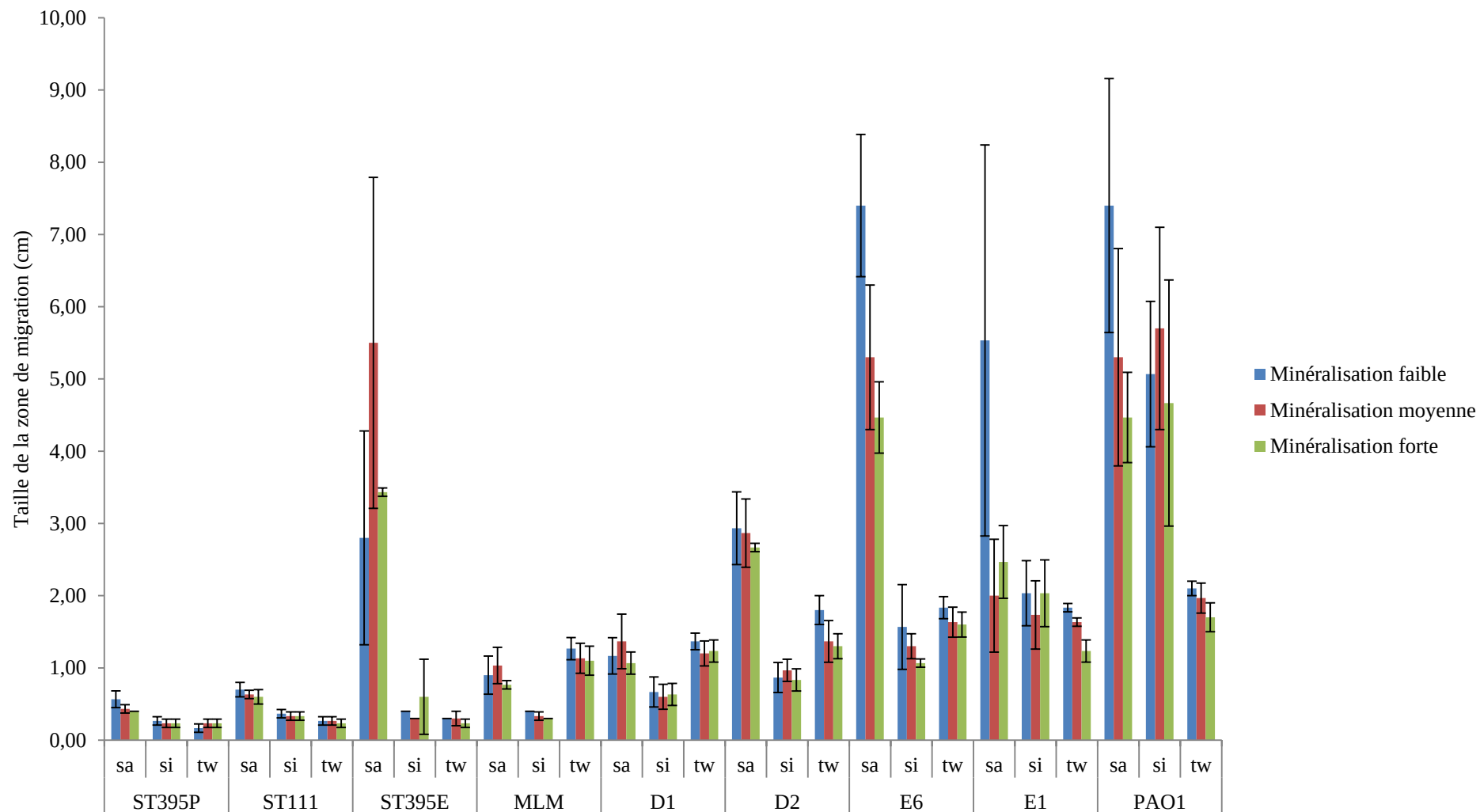
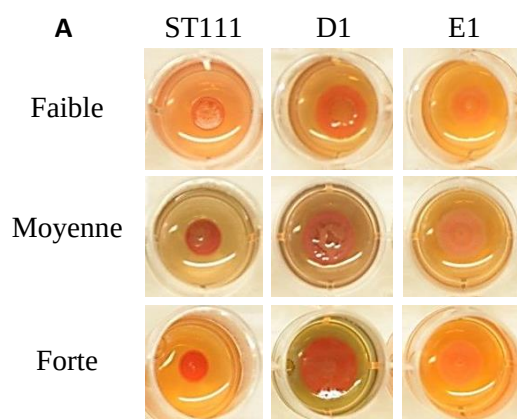


Figure 24 : Evaluation des capacités de mobilité des souches de *P. aeruginosa* : taille de la zone de migration sur des milieux spécifiques à chacune des mobilités de type « swarming » (sa), « swimming » (si) ou « twitching » (tw) selon la condition de minéralisation. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.

2. Capacité de synthèse des exopolysaccharides : test rouge congo et qRT-PCR.

L'influence du contenu minéral naturel des eaux testées a été étudiée sur les capacités de synthèse d'exopolysaccharides des souches de *P. aeruginosa*, d'une part à l'échelle phénotypique (figure 25A) et d'autre part à l'échelle transcriptomique (figure 25B). Dans ce dernier cas, l'expression des gènes *algU*, *pelB* et *pslA* codant pour des enzymes respectivement indispensables à la biosynthèse de l'alginate, du Pel et du Psl a été évaluée par qRT-PCR pour les souches ST111, D1 et E1 (figure 25B). La souche ST111 a été choisie en raison de son caractère de fort producteur de biofilm tandis que les souches E1 et D1 ont été choisies pour leurs origines environnementales. Le niveau d'expression des gènes testés a été évalué sur des cultures bactériennes en phase de croissance exponentielle de façon à obtenir un ratio nombre de cellules/contenu en ARN des cellules performant. Bien qu'aucun effet souche n'ait pu être observé à l'échelle phénotypique, une différence d'expression des gènes testés est visible entre les souches (figure 25B). La souche ST111 présente des niveaux d'expression plus élevés pour *algU*, *pelB* et *pslA* à l'inverse de la souche D1 qui présente les niveaux les plus faibles parmi les trois souches testées, ces différences d'expression étant plus marquées pour *pslA*.

Pour ces trois souches, aucune influence du contenu minéral des eaux testées n'est visible, tant à l'échelle phénotypique qu'à l'échelle transcriptomique (figure 25B).



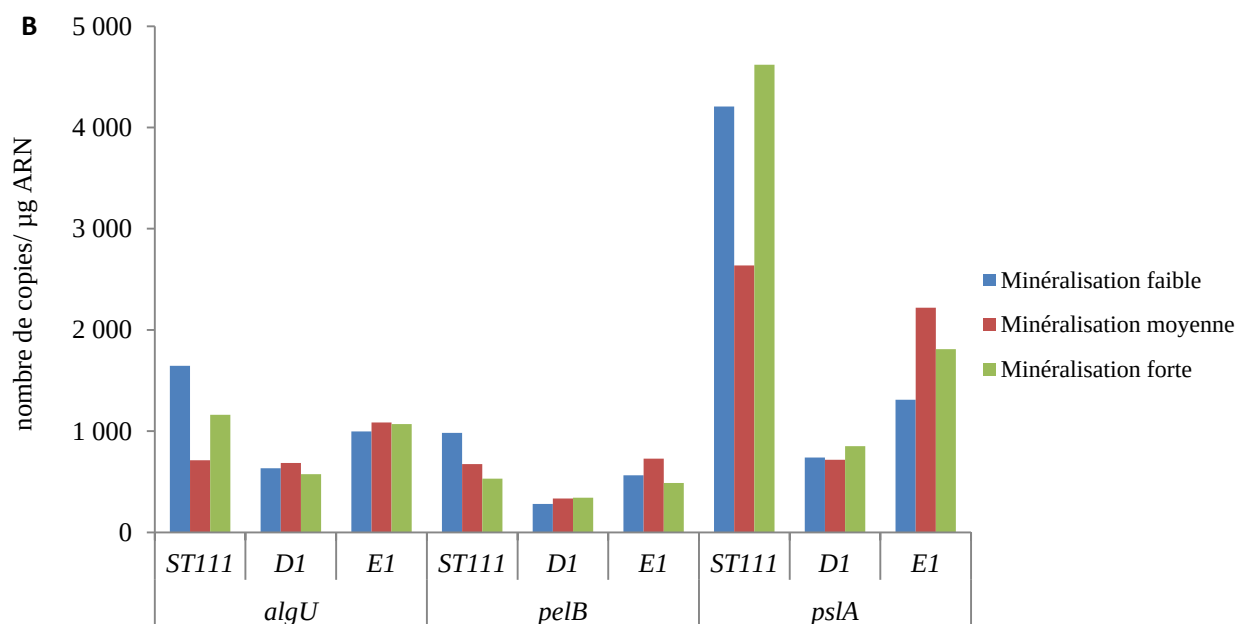


Figure 25 : Influence du contenu minéral naturel des eaux testées sur la production d'exopolysaccharides des souches ST111, D1, et E1 (A) à l'échelle phénotypique globale et (B) à l'échelle transcriptomique par évaluation du niveau d'expression des gènes *algU*, *pelB* et *psIA*.

3. Facteurs de virulence : production de pyoverdine et de pyocyanine.

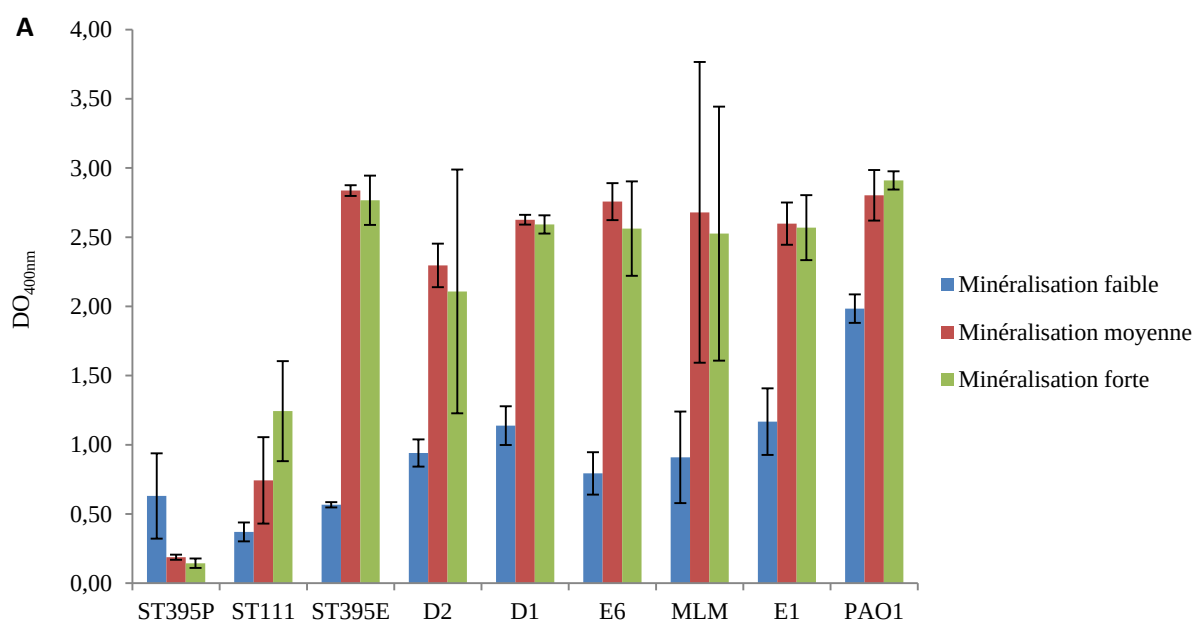
Des différences de pigmentation allant du jaune-vert au vert foncé ont pu être observées pour des cultures de 24 h des souches du panel selon les conditions de minéralisation, chacune de ces conditions présentant une concentration en fer total identique. Des différences significatives ont été observées entre les souches pour les mesures de DO_{400nm} ($p < 0,0001$), caractéristiques de la pyoverdine (figure 26A), et pour les mesures de DO_{691nm} ($p < 0,0001$), caractéristiques de la pyocyanine (figure 26B). Bien que le test non paramétrique utilisé pour l'analyse statistique des données ne soit pas assez puissant pour proposer une classification des souches selon leur niveau de production, des comportements spécifiques sont notables. Les souches ST395P et ST111 présentent les mesures de DO_{400nm} les plus faibles du panel quelle que soit la minéralisation considérée. Les autres souches testées présentent des profils similaires pour les trois conditions de minéralisation, excepté la souche de référence PAO1 qui présente des valeurs plus élevées en minéralisation faible (figure 26A).

En ce qui concerne les mesures de DO_{691nm} , deux groupes de souches se distinguent : les souches ST395P, ST111, ST395E, D2 et D1 présentent des mesures inférieures ou proches de 0,1 quelle que soit la minéralisation considérée tandis que les autres souches présentent des mesures proches ou supérieures à 0,2 en condition de minéralisation faible. La souche MLM présente un comportement incertain du fait de l'importante variabilité entre les réplicats réalisés

(figure 26B). La souche PAO1 est la seule souche présentant des mesures de DO_{691nm} supérieures à 0,3 en condition de minéralisation faible (figure 26B).

Un impact significatif du contenu minéral des eaux testées sur les mesures de DO_{400nm} a pu être mis en évidence. Les valeurs obtenues en condition de minéralisation faible étaient significativement plus faibles que celles obtenues en conditions de minéralisation moyenne et forte ($p < 0,0001$) (figure 26A). Les valeurs obtenues dans ces deux conditions ne présentaient pas de différence significative entre elles ($p = 0,808$). La présence de pyoverdine libre dans les surnageants de culture après filtration a été confirmée par observation de la fluorescence sous lumière ultra-violette (figure 27). Les surnageants obtenus en conditions de minéralisation moyenne et forte présentaient une forte intensité de fluorescence comparés à ceux obtenus en condition de minéralisation faible.

Un effet significatif de la minéralisation sur les mesures de DO_{691nm} a également été souligné avec des valeurs significativement plus élevées en minéralisation faible qu'en minéralisations moyenne et forte ($p < 0,0001$), sans différence significative entre ces dernières ($p = 0,390$) (figure 26B).



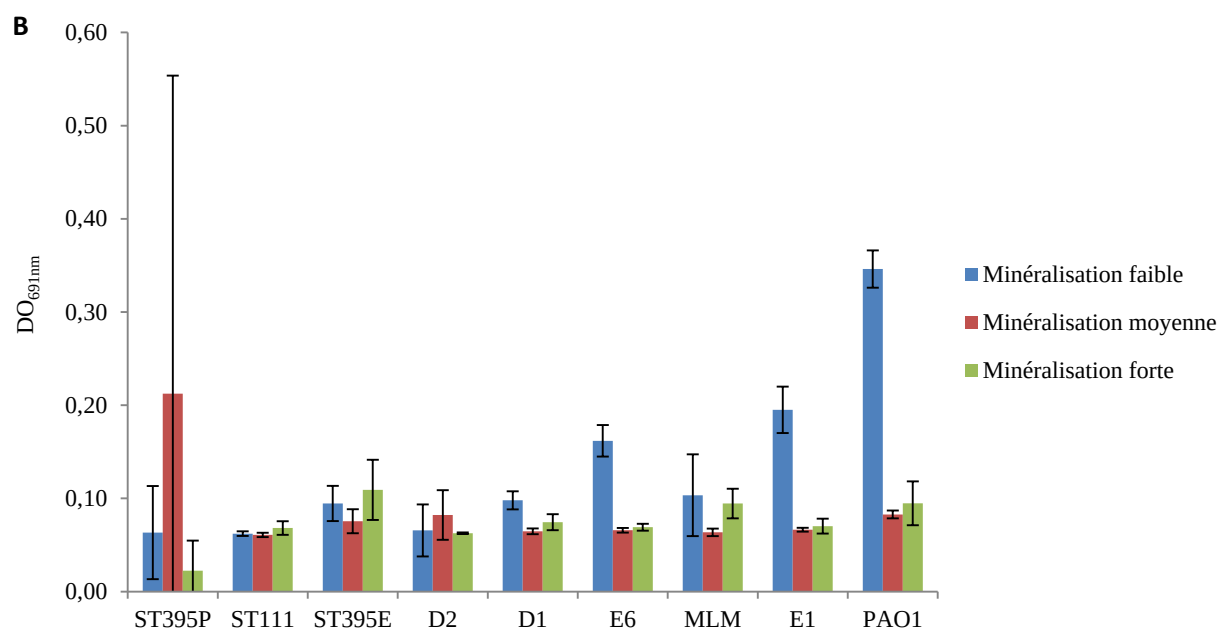


Figure 26 : Influence du contenu minéral naturel des eaux sur (A) la production de pyoverdine par mesure de l'absorbance à 400 nm et (B) la production de pyocyanine par mesure de l'absorbance à 691 nm. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.

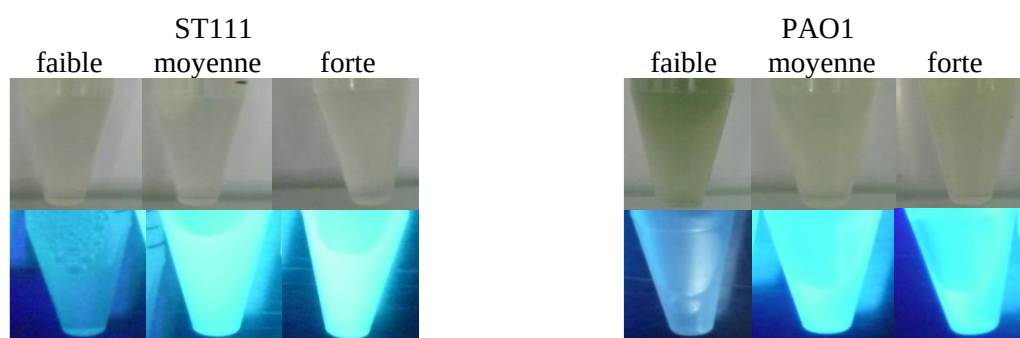


Figure 27 : Surnageants des souches ST111 et PAO1 obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C en condition de minéralisation faible, moyenne ou forte : (A) pigmentation naturelle et (B) fluorescence sous UV.

4. Liens entre le contenu minéral naturel des eaux et la production de pyoverdine et de pyocyanine : analyse en composantes principales.

Une analyse en composantes principales (ACP) incluant les caractéristiques physicochimiques des milieux M63 préparés dans les trois eaux minérales et prenant en compte les concentrations des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- et les niveaux de production de pyoverdine (PVD) et de pyocyanine (PCN) a été effectuée. Les coefficients de corrélation entre les éléments testés proviennent de la matrice de corrélation de Pearson associée à l'ACP (tableau 24).

Aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre le niveau de production de PCN et les concentrations en ions des eaux. A l'inverse, le niveau de production de PVD montre des corrélations positives avec les concentrations en Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- et des corrélations négatives avec les concentrations en Na^+ , K^+ et NO_3^- (tableau 24).

Tableau 24 : Matrice de corrélation de Pearson. Les valeurs inscrites en gras indiquent des facteurs de corrélations significatifs entre les paramètres testés.

Variables	PVD	PCN
PVD	1	0,188
PCN	0,188	1
Ca^{2+}	0,456	0,008
Mg^{2+}	0,513	0,019
Na^+	-0,570	-0,035
K^+	-0,571	-0,052
Cl^-	0,565	0,033
NO_3^-	-0,566	-0,053
SO_4^{2-}	0,306	0,013
HCO_3^-	0,580	0,040

IV. Discussion.

L'influence du contenu minéral naturel des eaux sur l'induction de mécanismes bactériens connus comme étant impliqués dans la formation précoce du biofilm de *P. aeruginosa* a été étudiée dans cette partie. Les comportements de neuf souches d'origine diverse ont été évalués pour les capacités de mobilité, de synthèse d'exopolysaccharides et de production de facteurs de virulence.

Les résultats obtenus pour chacun de ces éléments et pour la capacité de formation du biofilm de chacune des souches peuvent être comparés. Dans la partie 3, les différences significatives de formation de biofilm observées entre les souches toute minéralisation confondue a conduit à leur classification en trois catégories. La catégorie A regroupe les souches MLM, D2 et ST395E faiblement productrices de biofilm, la catégorie B réunit les souches E6, PAO1, E1, D1 et ST395P présentant des capacités de formation de biofilm modérées et la catégorie C comprend uniquement la souche ST111 fortement productrice de biofilm. La comparaison montre qu'aucune des trois catégories de formation de biofilm ne peut être reliée à un comportement de mobilité ou de production de facteurs de virulence en particulier. La combinaison de ces paramètres bactériens définit un profil biologique pour chacune des souches testées (tableau 25). Aucune catégorie de formation de biofilm n'est strictement définie par un profil biologique spécifique.

Tableau 25 : Catégorie de formation de biofilm et profil biologique toute minéralisation confondue pour chacune des souches du panel.

Souche	Catégorie de formation de biofilm	Profil biologique				
		Mobilité			Facteurs de virulence	
		Swarming	Swimming	Twitching	Pyoverdine	Pyocyanine
MLM	A	-	-	-	+	-
D2	A	+	-	-	+	-
ST395E	A	+	-	-	+	-
E6	B	+	+	+	+	+
PAO1	B	+	+	+	+	+
E1	B	+	+	+	+	+
D1	B	-	-	-	+	-
ST395P	B	-	-	-	-	-
ST111	C	-	-	-	-	-

Mobilité : - < 0,2 cm ; + > 0,2 cm

Pyoverdine : - < 2 ; + > 2

Pyocyanine : - < 0,10 ; + > 0,10

Le profil biologique de ST111 est cohérent avec son comportement d'implantation : des capacités de mobilité réduites associées à de fortes capacités d'expression des gènes codant pour des enzymes indispensables à la synthèse d'exopolysaccharides et à une charge de surface favorable à l'adhésion sont susceptibles d'expliquer ici ses fortes capacités de formation de biofilm.

Le profil biologique de ST111 concorde avec celui défini pour des isolats de *P. aeruginosa* isolées de bactériémies et qualifiées de « à haut risque » du fait de leurs propriétés de résistance aux antibiotiques élevées. Mulet *et al.* (2013) montrent que ces isolats sont caractérisés par des capacités de formation de biofilm élevées, associées à des capacités de mobilité et de production de pyoverdine et de pyocyanine limitées et à une fréquence de mutations spontanées élevée. Bien que les conditions expérimentales de cette étude diffèrent de celles menées ici, ces similarités, combinées à l'origine hospitalière de ST111, soulèvent la question de ses capacités de résistance aux séquences de nettoyage et de désinfection pratiquées dans les réseaux de distribution d'eau thermique.

L'influence des minéraux sur l'induction de mécanismes bactériens impliqués dans la formation du biofilm de *P. aeruginosa* n'est rapportée que pour un nombre limité d'ions avec un intérêt plus particulier pour l'influence des cations Ca^{2+} et Mg^{2+} . L'effet des concentrations en Ca^{2+} sur l'induction de la mobilité de type « swarming » et de la synthèse d'exopolysaccharides a été respectivement décrit par Guraguain *et al.* (2013) et Patrauchan *et al.* (2007). Ces effets ont été rapportés pour des concentrations en Ca^{2+} , d'approximativement 5 mM et 10 mM, proches de celles retrouvées dans les eaux minérales naturelles testées. Les tests menés dans notre étude, caractérisée par un milieu minéral complexe, ne montrent aucun effet significatif de la minéralisation sur la mobilité ou la synthèse d'exopolysaccharides par les souches de *P. aeruginosa* étudiées. Les études citées ici ont démontré l'influence d'un unique ion apporté en concentration contrôlée dans un milieu de culture. L'action spécifique de cet ion est susceptible d'être masquée par des effets synergiques ou antagonistes pouvant avoir lieu entre les multiples ions contenus dans les eaux minérales naturelles utilisées ici. De plus, l'effet des contre-ions n'a pas été pris en compte.

Contrairement à la mobilité et à la synthèse d'exopolysaccharides, une influence significative du contenu minéral des eaux a été observée sur la production de facteurs de virulence. L'action spécifique de certains ions sur la production de pyoverdine (PVD) a pu être mise en évidence. Des corrélations positives ont été observées entre la production de PVD et les concentrations en Cl^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- . Une des hypothèses envisagée pour expliquer ces

corrélations est relative à la biodisponibilité du fer. En effet, il est notoire que Cl^- et SO_4^{2-} possèdent de fortes propriétés de complexation du fer, au même titre que les anions OH^- et PO_4^{3-} (Smith et Martell, 1989). Des propriétés chélatrices du fer ont également été rapportées pour l'anion HCO_3^- malgré sa faible affinité pour ce métal (Dumas *et al.*, 2013). L'activité initiale de la PVD étant la capture et le transport de fer de l'environnement vers la cellule bactérienne, des concentrations limitées en fer disponible régulent positivement la synthèse de PVD chez *P. aeruginosa* (Imperi *et al.*, 2013). Les niveaux de production de PVD, plus élevés en conditions de minéralisation moyenne et forte qu'en condition de minéralisation faible, peuvent être expliqués par une complexation du fer plus importante dans ces contextes. La concentration en HCO_3^- est par exemple jusqu'à 5 fois plus élevée dans les eaux moyennement et fortement minéralisées. Cette hypothèse de différence de complexation selon les conditions de minéralisation est notamment appuyée par l'évaluation de la concentration initiale en fer, identique dans les trois conditions testées (5.10^{-9} M), le fer étant apporté par la dilution d'un milieu minimum. Cette concentration correspond à celle du fer libre dans l'environnement aérobie à pH neutre (Braun, 2001).

La complexation du fer par des éléments minéraux est susceptible d'affecter les capacités de formation de biofilm de *P. aeruginosa*. La formation de biofilm requière une concentration en fer plus élevée que celle nécessaire à la croissance planctonique (Weinberg, 2004). Des concentrations en FeCl_3 comprises entre 4 et 50 μM ont été rapportées comme favorables au développement de biofilm par la souche de référence PAO1 (Patriquin *et al.*, 2008). Des concentrations supérieures à 50 μM sont à l'inverse décrites comme défavorables à la formation de biofilm (Yang *et al.*, 2007), au même titre que des concentrations inférieures à 1 μM qui inhibent la formation de biofilm en promouvant la mobilité de type « twitching » et la production de rhamnolipides (Patriquin *et al.*, 2008). Les capacités de formation de biofilm et les niveaux de production de PVD suivent des évolutions inverses selon les conditions de minéralisations suggérant que la limitation en fer disponible agit comme un signal environnemental indiquant à la bactérie que les conditions de minéralisation moyenne et forte ne sont pas appropriées à son implantation.

L'influence des minéraux sur la synthèse de phénazines est également décrite dans la littérature. L'expression de certains gènes impliqués dans la synthèse de phénazine peut ainsi être inhibée par des concentrations limitées en Mg^{2+} (Guina, 2003) tandis qu'aucun effet sur la synthèse de pyocyanine (PCN) n'a été attribué à Ca^{2+} dans le cas de culture de PAO1 (Patrauchan *et al.*, 2007). La production de PCN ne présente ici aucune corrélation significative

avec un ion en particulier malgré une influence significative de la minéralisation globale. Comme évoquée précédemment, la complexité ionique des milieux utilisés est susceptible de masquer l'action spécifique liée à un unique ion tel que Mg^{2+} .

Bien que les niveaux de production de PVD et PCN soient tous deux influencés par la minéralisation, leur évolution contraire est en accord avec une étude démontrant l'effet inhibiteur de la PCN sur l'expression de *pvdA*, gène impliqué dans la synthèse de PVD (Dietrich *et al.*, 2006). Face à la forte dépense énergétique que constitue la production de PVD, la synthèse d'un facilitateur tels que PCN en supplément d'un système de capture et de transport du fer présentant une plus faible affinité pour Fe^{3+} , telle que la pyocheline, seconde famille de sidérophores synthétisée par *P. aeruginosa*, peut être plus appropriée pour la bactérie (Dumas *et al.*, 2013).

En plus de son influence sur la synthèse de PVD, le niveau de production de PCN présente des évolutions similaires à la capacité de formation de biofilm selon la condition de minéralisation considérée. Cette relation est en accord avec une étude récente démontrant l'implication de PCN sur la formation et le maintien du biofilm de *P. aeruginosa* (Das et Manefield, 2012). L'oxydation de la PCN génère une augmentation du stress oxydatif par production d'espèces réactives de l'oxygène telles que H_2O_2 dont la présence augmente la lyse cellulaire. Une augmentation de la libération d'ADN extracellulaire (ADNe) résulte de cette lyse malgré les stratégies de protection adoptées par la bactérie telles que la production de catalase, enzyme dégradant le peroxyde d'hydrogène, ou la production d'oxyde dismutase (Das et Manefield, 2012). Les interactions physiques s'établissant entre la PCN et l'ADNe favorisent la fixation de ce dernier à la surface des cellules bactériennes. Les modifications de surface résultant de cette fixation augmentent l'agrégation des cellules et leur adhésion promouvant ainsi la formation de biofilm (Das *et al.*, 2013). Le complexe PCN/ADNe agit également comme élément support de la structure de la matrice extracellulaire en contribuant à la stabilité des autres composés polysaccharidiques sécrétés à la surface des cellules (Das *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus dans cette partie soulignent la difficulté d'expliquer la formation et le développement de biofilm par le suivi de quelques paramètres biologiques. Cependant, l'influence du contenu minéral naturel des eaux, observée précédemment sur les capacités de formation de biofilm de *P. aeruginosa*, semble être majoritairement liée à la biodisponibilité du fer.

La qualité de l'eau, illustrée par sa composition minérale, n'est pas le seul élément susceptible d'influencer la formation de biofilm dans un réseau de distribution d'eau thermique. Les matériaux constitutifs de ces réseaux peuvent promouvoir ou inhiber l'implantation de la bactérie selon leur nature et leurs caractéristiques physicochimiques. Cette influence peut avoir un impact sur l'efficacité des séquences de nettoyage et de désinfection mises en place pour le traitement de ces réseaux.

Cinquième partie :

**Influence de la nature des matériaux sur les
capacités de *P. aeruginosa* à former du
biofilm et étude de l'efficacité de produits
de traitements.**

I. Introduction.

Du fait de leur utilisation thérapeutique et de leurs formes d'administration (inhalation, aérosolisation, ingestion), les eaux thermales se doivent d'être exemptes de microorganismes pathogènes et sont à ce titre soumises à des contrôles de qualité microbiologique très stricts. La composition des eaux minérales naturelles est supposée être constante et ne doit pas être altérée au cours de son exploitation (Petraccia *et al.*, 2006). Le maintien de la qualité microbiologique des eaux thermales ne peut donc pas être assuré par la présence d'un désinfectant en concentration résiduelle à l'image du chlore dans les réseaux de distribution d'eau potable. Les seuls traitements de l'eau minérale naturelle autorisés, identiques à ceux utilisés par l'industrie de l'embouteillage, sont restreints à l'élimination de certains constituants instables tels que le fer, le manganèse, l'arsenic ou les composés sulfurés par filtration, décantation ou par traitement à l'aide d'air enrichi en azote. Pour atteindre le niveau de qualité microbiologique exigé, l'utilisation d'un traitement de l'eau par rayons ultra-violet ou par membranes filtrantes est autorisée en amont des postes de soins (Popoff, 2010). Cependant, les principales mesures appliquées, conformément à la réglementation, reposent sur des séquences de nettoyage et de désinfection des réseaux de distribution en dehors des périodes d'utilisation de l'eau par les curistes. Le nettoyage permet l'élimination des dépôts organiques ou inorganiques, généralement composés de carbonates de calcium et/ou d'hydroxydes de fer et de manganèse (DGS, 2000), susceptibles d'interférer avec les produits de désinfection et d'altérer leur efficacité (McDonnell et Russell, 1999). La réglementation française autorise le recours à des procédures de nettoyage physique, tels que l'écoulement d'eau à 1 m/s ou l'utilisation d'obus racleur, et à des procédures de nettoyage chimique utilisant des mélanges d'acide, de réducteur et d'inhibiteur de corrosion (DGS, 2000). La désinfection est principalement réalisée via des traitements thermiques ou chimiques basés sur l'utilisation de soude, de chlore ou de peroxyde d'hydrogène (DGS, 2000). A l'issue de chacune des séquences de nettoyage ou de désinfection, les réseaux de distribution sont rincés avec de l'eau thermique ou de l'eau potable jusqu'à l'élimination complète de toute trace de produits chimiques (DGS, 2000).

Ces séquences peuvent être pratiquées en conditions dynamiques ou statiques. Les conditions dynamiques sont caractéristiques des procédures de nettoyage en place (NEP) définies comme le nettoyage et la désinfection d'éléments complets d'un réseau de canalisation par la circulation d'eau et de produits chimiques sans démontage ou ouverture de ses éléments constitutifs (Bremer *et al.*, 2006). L'eau utilisée pour préparer et véhiculer les biocides utilisés peut provenir d'un réseau de distribution parallèle à celui de l'eau thermique, comme par

exemple le réseau de distribution d'eau potable desservant l'établissement. La circulation de l'eau dans le système peut suivre un circuit ouvert à l'issue duquel l'eau circulante est rejetée à l'égout, ou un circuit fermé dans lequel l'eau circulante est recyclée et réinjectée dans le système de nettoyage.

Les éléments de conception plus complexe sont susceptibles d'altérer l'efficacité du NEP (Timperley, 1989), c'est pourquoi les pièces amovibles et démontables des postes de soins subissent des traitements statiques. Ces derniers comprennent une étape de brossage lors du nettoyage de façon à optimiser l'élimination des dépôts minéraux suivie d'un rinçage et d'une désinfection par immersion dans des bains d'eau potable ou de solutions désinfectantes.

Les traitements sont appliqués en action préventive de façon à limiter tout risque de contamination ou en action curative en réponse à une contamination constatée lors des autocontrôles effectués par l'établissement thermal ou lors des contrôles réglementaires. L'efficacité des séquences de nettoyage et de désinfection utilisées pour lutter contre les contaminations dépend :

- des microorganismes concernés. Certaines espèces de microorganismes sont douées d'importantes capacités de résistance. De la même façon certains états métaboliques, tels que l'état VBNC, sont susceptibles d'interférer avec le mode d'action des biocides.
- de la localisation des microorganismes dans le réseau de distribution.
- de la conception du réseau de distribution. L'existence de zones difficilement accessibles par la solution de traitement ainsi que certains matériaux constitutifs des réseaux de distribution peuvent interférer avec l'action des biocides. Le cuivre a ainsi été rapporté comme diminuant l'activité du chlore dans les réseaux de distribution d'eau potable (Lethola *et al.*, 2005).
- de la qualité de l'eau circulante. La présence de matière organique ou inorganique est susceptible d'altérer l'efficacité des produits utilisés au même titre que la température ou le pH. Une température élevée est susceptible de dégrader les substances actives des produits utilisés (Russell, 2003).
- des produits utilisés et de leurs conditions d'utilisation tels que leur concentration, leur temps de contact ou le pH nécessaire à une action optimale de leurs substances actives (Russell, 2003).

Malgré les actions préventives et/ou curatives mises en place pour lutter contre les problèmes de contaminations microbiologiques, plus de 80 % des établissements thermaux français ont été contaminés par *L. pneumophila*, *Legionella spp.* ou *P. aeruginosa* au cours de

l'année 2001 (DGS, 2005). Sur l'ensemble de ces contaminations les deux tiers étaient dues à la présence de *P. aeruginosa* principalement détectée au point d'usage (DGS, 2005).

Le développement de biofilms de *P. aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermique peut être influencé par les paramètres d'exploitation du réseau de distribution. Nous avons mis en évidence dans la partie 3 que la minéralisation de l'eau influence les capacités de *P. aeruginosa* à former du biofilm. Il a ainsi été montré que les eaux peu chargées en minéraux favorisent la formation de biofilm. L'action spécifique de certains ions a pu être soulignée. Les ions HCO_3^- , SO_4^{2-} et Cl^- seraient impliqués dans la limitation de la biodisponibilité du fer, élément essentiel à la régulation de mécanismes complexes intervenant dans la constitution des biofilms de *P. aeruginosa*.

Pour compléter l'étude de l'influence de l'environnement propre au réseau de distribution d'eau minérale naturelle sur le comportement de *P. aeruginosa*, l'influence de matériaux constitutifs des réseaux de distribution sur les capacités de formation de biofilms de *P. aeruginosa* et l'efficacité d'une séquence de traitement ont été étudiées.

Ces essais ont été réalisés en condition de minéralisation forte à partir d'une eau minérale naturelle embouteillée modélisant une eau thermique fortement minéralisée.

La souche ST111, identifiée préalablement comme la souche la plus fortement productrice de biofilm du panel toute minéralisation confondue, a été utilisée pour ces essais.

Les biofilms de la souche ST111 ont été développés sur des coupons de 6 matériaux (cuivre, inox 316 L, laiton, PVC-C, EPDM et PE) connus comme étant constitutifs des réseaux d'eau potable ou d'eau thermique. Le cuivre, l'inox et le laiton sont plus particulièrement caractéristiques des canalisations et éléments de robinetterie tandis que les matériaux organiques sont plus spécifiques des éléments constituant les points d'usage. L'effet des matériaux sur le développement de biofilms par la souche ST111 a été évalué sur des biofilms de 24 h.

L'efficacité d'une séquence de nettoyage et de désinfection a été étudiée sur les biofilms de ST111 développés sur les différents matériaux évoqués ci-dessus. Le traitement appliqué ici (produits, temps de contact, rinçages) correspond à une séquence de nettoyage et de désinfection utilisée dans un établissement thermique et réalisée en conditions statiques pour le traitement préventif d'éléments amovibles de postes de soins. Le but étant d'attester de son efficacité en conditions réelles sur l'implantation de *P. aeruginosa*, l'action de la séquence de nettoyage et de désinfection a été étudiée sur des biofilms de ST111 de 24 h, en raison de la fréquence quotidienne des pratiques de traitements appliquées en établissements thermiques. Cette

efficacité a été évaluée à court terme par l'étude du biofilm restant à l'issue immédiate de la séquence de traitement et à plus long terme par le suivi de la recroissance du biofilm une semaine après traitement.

L'étude du biofilm dans ces conditions particulières a été réalisée comme précédemment en utilisant un indicateur global de formation de biofilm (cristal violet) et un indicateur de l'activité métabolique globale au sein du biofilm (ATP intracellulaire) et en suivant la production de pyoverdine et de pyocyanine en tant qu'indicateur de l'état métabolique des cellules bactériennes. Le développement du biofilm à la surface des matériaux a également été étudié par observation au microscope électronique à balayage (MEB).

II. Matériel et méthodes.

1. Coupons de matériaux : format et conditionnement.

Des coupons de cuivre, de laiton, d'acier inoxydable 316 L, de polyéthylène (PE), de polychlorure de vinyle surchloré (PVC-C) et d'éthylène-propylène-diène monomère (EPDM) ont été utilisés. Les spécifications de chacun de ces matériaux sont détaillées dans le tableau 26. Deux types de coupons ont été utilisés pour chacun des matériaux : des coupons de forme rectangulaire (64 mm x 40 mm) pour l'étude de la formation de biofilm à l'interface air/liquide (figure 28) et des coupons circulaires ($\varnothing$ 7 mm) adaptés à l'observation en microscopie électronique à balayage (figure 28). L'épaisseur des coupons métalliques est de 2 mm tandis que celle des coupons de matériaux organiques est comprise entre 3 et 5 mm.

Les coupons des deux formats ont été nettoyés avant utilisation par immersion totale dans un bain d'éthanol à 70 % pendant 10 min avant de subir une sonication d'une heure à 60 °C et deux rinçages successifs de 10 min par immersion totale dans de l'eau déminéralisée stérile à 60 °C. Les coupons ont ensuite été séchés à l'air libre en conditions stériles sous poste de sécurité microbiologique. L'efficacité du protocole de nettoyage a été évaluée en s'assurant de l'absence de flore aérobie revivifiable dans la dernière eau de rinçage. A cet effet, 50 mL ont été filtrés sur membrane 0,45 μ m incubées sur milieu PCA pendant 4 jours à 30 °C avant dénombrement.

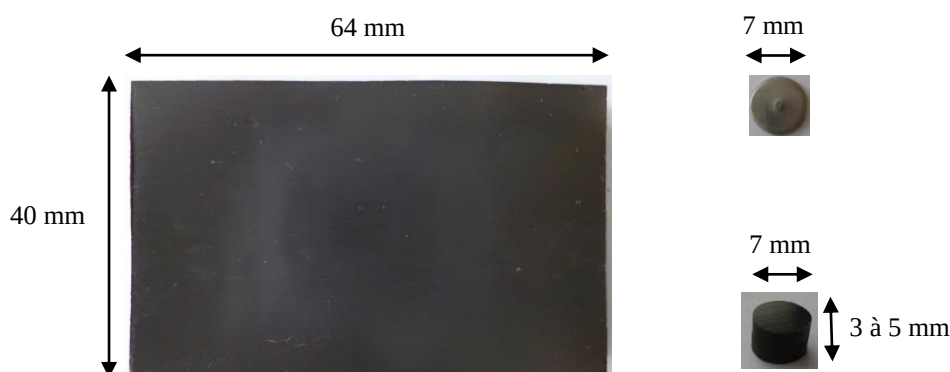


Figure 28 : Cotes des coupons rectangulaires (PVC-C) et des coupons circulaires utilisés dans cette étude.

Tableau 26 : Spécifications réglementaires et caractéristiques de certains des matériaux utilisés dans cette étude.

Matériaux	Spécifications réglementaires	Caractéristiques
Cuivre (écroui ⁶)	NF EN 1057 + A1	Cu + Ag : 99,90 % min, Phosphore : 0,015 % - 0,040 % Masse volumique : 8,9 g/cm ³ Coefficient de dilatation entre 20 et 100 °C : 17.10 ⁻⁶ m/m.K. Conductivité thermique à 23 °C: 328 W/m.K. Etat de surface/aspect visuel : lisse, rigide
Laiton CuZn36 (écroui)	NF EN 1652	Concentration maximale : Cu : 65,5 % ; Al : 0,02 % ; Fe : 0,05 % ; Ni 0,3 % ; Pb : 0,05 % ; Sn : 0,1 % ; Zn : 33,98 % Masse volumique : 8,4 g/cm ³ Coefficient de dilatation entre 20 et 100 °C : 20.10 ⁻⁶ m/m.K. Conductivité thermique à 23 °C: 120 W/m.K. Etat de surface/aspect visuel : lisse, rigide
Inox 316 L	-	316 : plus résistant à la corrosion grâce à l'ajout de 2 à 3 % de molybdène dans sa formulation ; L : formule pauvre en carbone Masse volumique : 7,9 g/cm ³ Coefficient de dilatation entre 23 et 100 °C : 16,5.10 ⁻⁶ m/m.K. Conductivité thermique à 23 °C : 15 W/m.K. Etat de surface/aspect visuel : lisse, rigide
PVC-C	sous avis technique : ATEC 14/08-1316	Taux de chlore > 60 % en masse (ISO 1158) Masse volumique : 1450.10 ³ – 1650.10 ³ g/cm ³ Coefficient de dilatation entre 20 et 100 °C : 65.10 ⁻⁶ m/m.K. Conductivité thermique à 23 °C : 0,16 W/m.K. Etat de surface/aspect visuel : lisse, rigide
PE500	anciennement cestilène	Masse volumique : 1 g/cm ³ Coefficient de dilatation entre 20 et 100 °C: 150.10 ⁻⁶ m/m.K. Conductivité thermique à 23 °C: 0,4 W/m.K. Absorption d'eau à saturation dans l'eau à 23 °C : 0,01 % Etat de surface/aspect visuel : lisse, rigide
EPDM	-	Etat de surface/aspect visuel : lisse, souple

2. Formation du biofilm : souche et conditions de culture.

La souche ST111 précédemment identifiée comme fortement productrice de biofilm (Partie 3. III.3) a été cultivée pendant la nuit en milieu Luria Broth (LB) sous agitation à 37 °C. Cet inoculum a été utilisé pour ensemer 30 mL de milieu M63 10X (20 g (NH₄)₂SO₄, 30 g KH₂PO₄ et 70 g K₂HPO₄ pour 1 L d'eau déminéralisée) préalablement dilué à 1X en eau minérale naturelle dite fortement minéralisée, pasteurisée 2 h à 60 °C avant utilisation. Comme évoqué précédemment, cette pasteurisation a pour objectif de s'affranchir des interférences

⁶ Métal écroui : métal ayant subi une déformation, à chaud ou à froid, au-delà de sa limite d'élasticité.

pouvant provenir de la flore autochtone des eaux minérales naturelles. Les caractéristiques physicochimiques de cette eau sont détaillées dans le tableau 19 (partie 2. II.2). Après dilution, le milieu M63 a été supplémenté en acides casamines à 0,5 %, en glucose à 0,2 % et en $MgCl_2$ à 1 mM et a été nommé M63F. L'ensemencement a été effectué de façon à obtenir une densité optique de 0,1 à une longueur d'onde de 600 nm (DO_{600nm}). Pour chacun des 6 matériaux, 3 couples de coupons ont été incubés 24 h à 30 °C dans un pot de prélèvement contenant du milieu M63F préalablementensemencé et un couple de coupons témoin a été incubé en M63F stérile. Les coupons ont été incubés inclinés dans le pot de prélèvement de façon à favoriser la formation d'un biofilm à l'interface air/liquide (figure 29).



Figure 29 : Coupon de PVC-C incubé dans un pot de prélèvement contenant 30 mL de milieu M63Fensemencé à partir d'une culture de la souche ST111.

3. Etude de l'efficacité d'un traitement sur le biofilm jeune de *P. aeruginosa*.

3.1 Séquence de nettoyage et de désinfection des coupons.

Pour chacun des matériaux, deux couples de coupons ont subi une séquence de nettoyage et de désinfection. Les caractéristiques des produits utilisés sont détaillées dans le tableau 27. Après 24 h d'incubation à 30 °C en milieu M63Fensemencé comme décrit ci-dessus en 2.2, les coupons ont été immergés 10 min dans 40 mL de détartrant Strip-A-Way (Ecolab®, France) dilué à 3 % en eau potable avant d'être rincés à l'eau potable. Les coupons rincés ont ensuite été immergés 1 h dans 40 mL de désinfectant SekuseptAktiv, reconstitué par mélange de 10 g de produit en poudre dans 1 L d'eau potable (Ecolab®, Suisse), avant d'être rincés à l'eau potable. Les coupons rincés ont ensuite été aspergés et laissés au contact du désinfectant de surface P3-Alcodes (Ecolab®, France) pendant 10 min avant d'être rincés à l'eau potable (figure 30).

Le rinçage à l'eau potable avant l'utilisation d'un nouveau produit a été réalisé par immersion dans 50 mL d'eau potable à raison de deux séquences de rinçages de 10 min.

L'absence de *P. aeruginosa* dans l'eau potable utilisée a été préalablement vérifiée : 250 mL d'eau potable ont été filtrés sur membrane 0,45 µm, incubées sur milieu sélectif cétrimide pendant 24 h à 37 °C avant dénombrement.

Tableau 27 : Description des produits de la marque Ecolab® utilisés pour la séquence de nettoyage et de désinfection.

Nom*	Forme initiale*	Substances actives (concentration)*	Temps de contact
Strip-A-Way (détartrant)	Liquide	Acide phosphorique (10-25 %) Acide nitrique (5-20 %) Alkyléthoxypropoxylates (1-5 %)	10 min
SekuseptAktiv (produit pour désinfection des instruments)	Poudre	Percarbonate de sodium (30-50 %) Acide citrique (10-20 %) Carbonate de sodium (2-5 %) Solubilisants/Additifs (1-2 %)	60 min
P3-Alcodes (désinfectant de surface)	Liquide (pulvérisateur)	Ethanol (≥ 50 % - ≤ 100 %)	10 min

*d'après la fiche de données de sécurité du produit.

3.2 Etude de l'efficacité du traitement à court terme.

Pour chacun des matériaux, l'effet de la séquence de nettoyage et de désinfection sur le biofilm a été évalué directement après traitement. Ces mesures ont été répétées sur un coupon neuf à une semaine d'intervalle des premières mesures (figure 27).

3.3 Etude de l'efficacité du traitement à long terme : recroissance après traitement.

Pour chacun des matériaux, un couple de coupons ayant subi la séquence de traitement décrite ci-dessus (3.3.1) a été incubé incliné dans un pot de prélèvement contenant 40 mL de M63F stérile pendant 7 jours à 30 °C. Deux réplicats par matériau ont été réalisés à une semaine d'intervalle (figure 30).

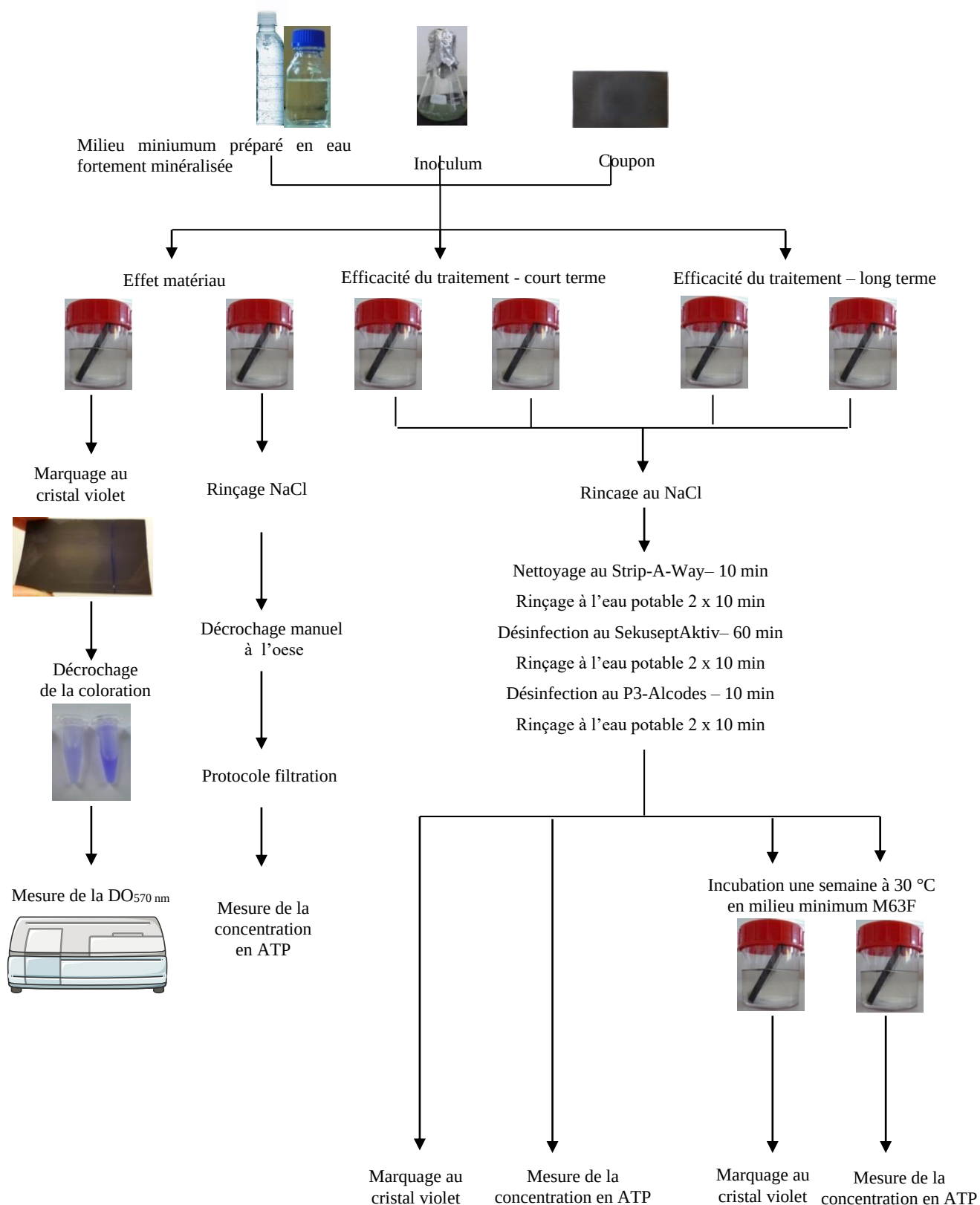


Figure 30 : Etapes du protocole utilisé pour étudier l'influence de la nature des matériaux sur la capacité de la souche ST111 à former du biofilm et sur l'efficacité d'une séquence de traitement.

4. Etude du biofilm.

4.1 Observation en microscopie électronique à balayage.

L'influence des matériaux sur les capacités de ST111 à former du biofilm a notamment été observée au MEB. Pour chacun des matériaux, des coupons circulaires ont été immergés dans une culture de ST111 à DO_{600nm} 0,1 en M63F pendant 24 h à 30 °C. La biomasse adhérente sur les coupons a été fixée par immersion dans du glutaraldehyde 3 % pendant 2 h à 4 °C. Les coupons ont ensuite été successivement rincés par immersion totale dans un bain de PBS 1X puis dans deux bains d'eau déminéralisée stérile, à raison de 10 min par bain. Les coupons ont ensuite été déshydratés par des étapes successives d'immersion totale dans un bain d'éthanol (Ethanol BioUltra for molecular biology $\geq 99,8$ %, Fluka Analytical, Suisse) de concentration croissante (tableau 28). Les coupons déshydratés ont été séchés à l'air en conditions stériles sous poste de sécurité microbiologique pendant 12 h avant d'être métallisés et observés au MEB (JSM 5800LV, JEOL, USA).

Tableau 28 : Protocole de déshydratation à l'éthanol des coupons. Les dilutions ont été réalisées en eau ultra-pure stérile.

Concentration du bain d'éthanol	Répétition de l'étape	Temps d'incubation de l'étape
50 %	2	2 min
70 %	2	5 min
90 %	2	10 min
100 %	1	5 min

4.2 Marquage au cristal violet.

La quantité de biofilm formé par la souche ST111 sur les différents matériaux et la quantité de biofilm restant après traitement ont été évaluées par marquage au cristal violet. Pour cela, 500 μ L de cristal violet 1 % ont été ajoutés dans le milieu de culture au contact d'un coupon de chacun des matériaux. Après 15 min d'incubation à température ambiante, les coupons ont été rincés deux fois par immersion totale dans un bain de PBS 1X (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 pour 1 L d'eau déminéralisée) pendant 10 min de façon à éliminer la coloration présente en excès. Après rinçage, la coloration marquant le biofilm formé à l'interface air/liquide sur les coupons a été décrochée manuellement à l'aide d'une pince et a été dissoute dans 1 mL d'éthanol 40 % avant d'être quantifiée par mesure de la densité optique à 570 nm (DO_{570nm}). Ces mesures ont été répétées sur un coupon neuf à une semaine d'intervalle des premières analyses (figure 30).

4.3 Mesure de l'activité métabolique globale au sein du biofilm : ATPmètrie.

L'activité des populations bactériennes au sein des biofilms de ST111 formés sur les différents matériaux et l'activité des populations bactériennes au sein de ces mêmes biofilms après traitement ont été évaluées par mesure de l'ATP intracellulaire. Pour cela, un coupon par matériau a été rincé par immersion dans un pot de prélèvement contenant 40 mL de NaCl (9 g NaCl pour 1 L d'eau déminéralisée). Les cellules adhérentes formant le biofilm à l'interface air/liquide ont été décrochées manuellement à l'oise et remises en suspension dans 40 mL de NaCl. L'ATP intracellulaire a été extrait et mesuré avec le kit QGA™-Quench Gone Aqueous (Aqua-Tools, France). Pour ce faire, la suspension de cellules a été filtrée avec un filtre seringue 0,7 µm afin d'éliminer l'ATP extracellulaire, les cellules retenues sur le filtre ont été lysées par filtration de 1 mL de solution de lyse UltraLyse 7™, le filtrat a été directement recueilli dans un tube de 9 mL de diluant Ultralute™ et la mesure d'ATP a été effectuée par ajout de 100 µL de luminase™ à 100 µL de filtrat dilués dans l'Ultralute™. Les données mesurées par le luminomètre (PhotonMaster™, LuminUltra®, Canada), initialement exprimées en unités relatives de lumière (RLU), ont été converties en concentration d'ATP (pg/mL) par le logiciel LumiCalc™ associé à l'appareil de mesure. Ces mesures ont été répétées sur un coupon neuf à une semaine d'intervalle des premières analyses (figure 30).

4.4 Mesure de la production de facteurs de virulence : analyse de spectre.

La production de facteurs de virulence par les populations bactériennes au contact des matériaux et cette même production par les populations bactériennes du biofilm une semaine après traitement ont été évaluées. Les cultures au contact des coupons de matériaux utilisés pour l'ATPmètrie ont été centrifugées pendant 10 min à 7 000 g. Une analyse de spectre a été effectuée sur le surnageant après filtration sur membrane 0,2 µm. Les valeurs d'absorbance mesurées à 400 nm (DO_{400nm}) et à 691 nm (DO_{691nm}) correspondent respectivement aux longueurs d'ondes d'absorbance maximale de la pyoverdine (Meyer *et al.*, 1978) et de la pyocyanine (Das et Manefield, 2012). Ces mesures ont été répétées sur un coupon neuf à une semaine d'intervalle des premières analyses.

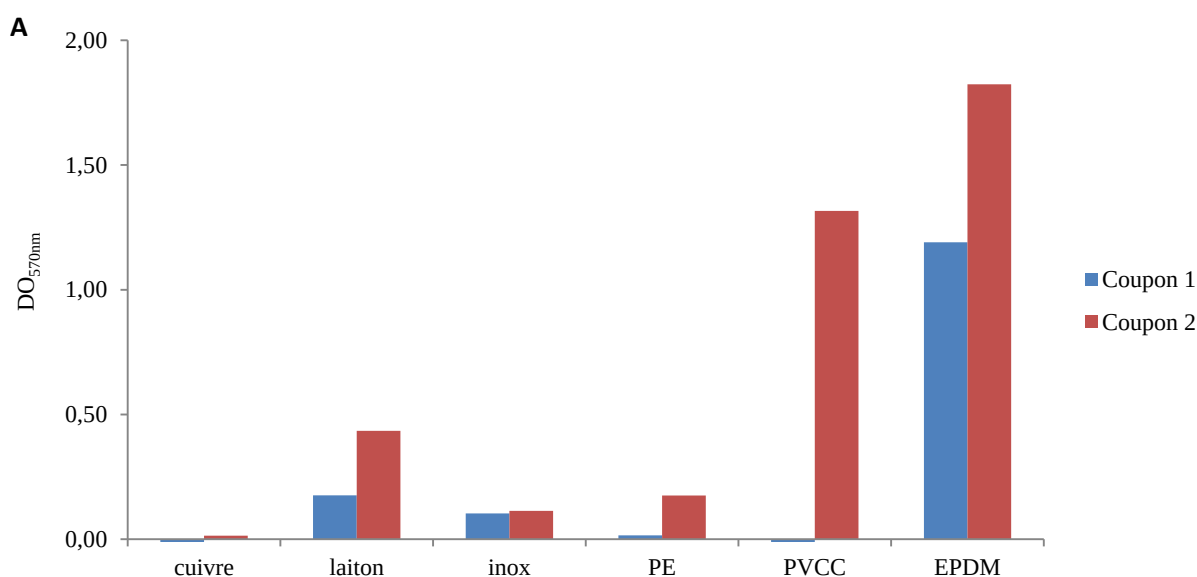
III. Résultats.

1. Etude de la capacité des matériaux à promouvoir la formation de biofilm.

1.1 Mesure de la formation globale de biofilm et de l'activité métabolique globale.

A l'issue du protocole de marquage au cristal violet, les mesures de DO_{570nm} obtenues sont plus faibles pour les matériaux métalliques, et plus particulièrement pour le cuivre, que pour les matériaux organiques (figure 31A). Les valeurs de DO_{570nm} mesurées pour l'EPDM sont les plus élevées des 6 matériaux testés : elles sont près de 100 fois plus fortes que celles mesurées pour le cuivre. Parmi les matériaux organiques, seul le PE présente des valeurs de DO_{570nm} proches de celles des matériaux métalliques.

Après décrochage, remise en suspension, filtration et lyse des cellules présentes au sein des biofilms, l'activité métabolique globale la plus faible ($< 6\,500\text{ pg d'ATP/cm}^2$) a été mesurée pour le cuivre et le laiton tandis que la plus forte ($> 100\,000\text{ pg d'ATP/cm}^2$) a été mesurée pour l'EPDM (figure 31B). Des activités métaboliques globales comprises entre $13\,000$ et $30\,000\text{ pg d'ATP/cm}^2$ ont été mesurées pour l'inox 316 L, le PE et le PVC-C.



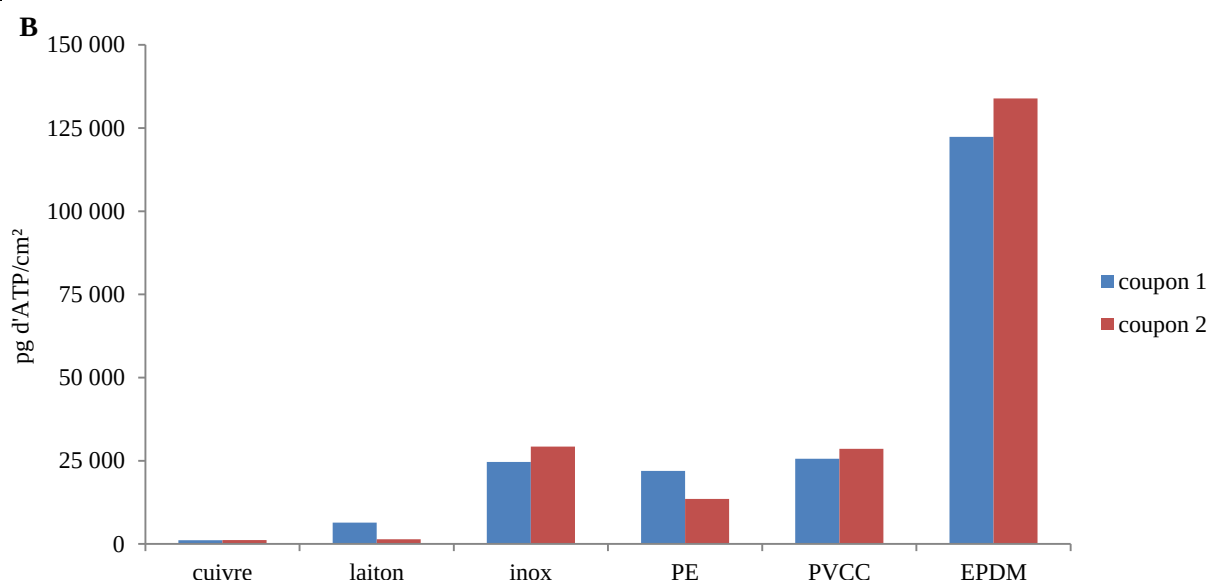


Figure 31: Influence de la nature des matériaux sur le biofilm de 24 h de la souche ST111 en milieu M63F : (A) mesure de la formation globale de biofilm et (B) mesure de l'activité métabolique globale au sein des biofilms.

1.2 Mesure de la production de facteurs de virulence.

Une analyse de spectre a été réalisée sur les surnageants des cultures au contact des coupons des différents matériaux. Il est à noter que la culture de ST111 ayant été au contact du cuivre présentait une couleur bleue. Les valeurs de DO_{400nm} mesurées, correspondant à la longueur d'onde d'absorbance maximale de la pyoverdine, sont les plus élevées pour les cultures ayant été au contact du cuivre et du laiton, sans différence marquée entre les deux matériaux (figure 32). Les DO_{400nm} mesurées pour les cultures ayant été au contact des autres types de matériaux sont toutes proches de 1. Les valeurs de DO_{691nm} mesurées, correspondant à la longueur d'onde d'absorbance maximale de la pyocyanine, sont toutes inférieures à 0,01 quel que soit le matériau considéré.

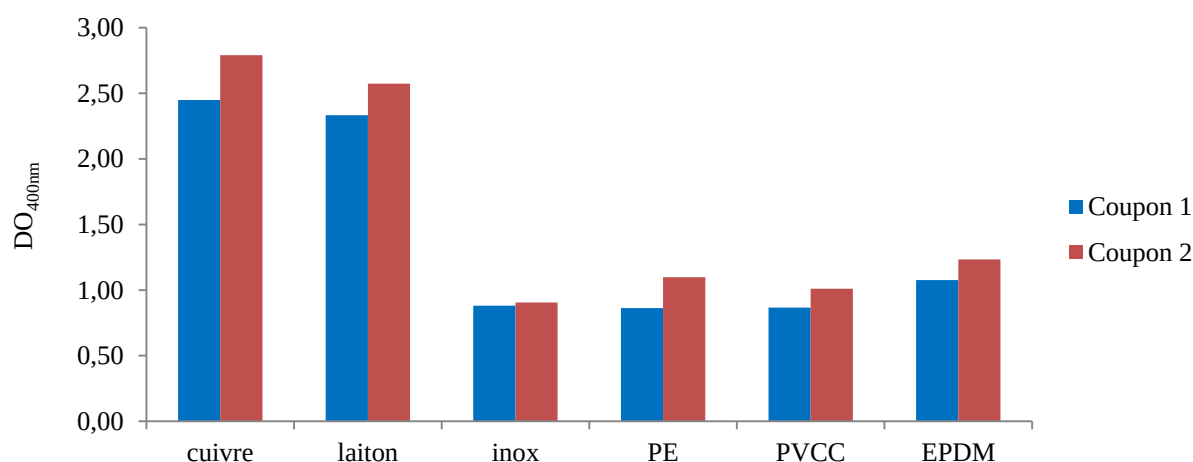


Figure 32 : Influence de la nature des matériaux sur la capacité de la souche ST111 à produire de la pyoverdine après 24 h d'incubation à 30 °C en milieu M63F.

1.3 Observations en microscopie électronique à balayage.

Après incubation dans une culture de ST111 à DO600nm 0,1 en M63F pendant 24 h à 30 °C, un coupon circulaire de chacun des matériaux a été fixé, déshydraté, séché et métallisé avant d'être observé au MEB.

L'aspect de la surface des différents matériaux diffère (figure 33). Les coupons métalliques présentent des surfaces similaires avec un aspect crevassé ou écaillé. Le PE présente une surface à l'aspect lisse tandis que la surface du PVC-C montre de nombreux pores de tailles et de formes diverses. La surface de l'EPDM arbore un aspect granuleux et comprend quelques pores.

L'observation du développement de ST111 sur la surface des différents coupons de matériaux (figure 34A et B) montre une colonisation moindre pour les matériaux métalliques avec peu voire aucune bactérie adhérente sur le cuivre et quelques bactéries isolées disséminées sur la surface du laiton et de l'inox 316 L. Les matériaux organiques montrent une colonisation plus étendue avec de petits regroupements de bactéries éparses adhérentes sur le PVC-C, des macrocolonies partiellement enchâssées dans de la matrice extracellulaire associées à la formation de microcolonies éparses sur la surface de l'EPDM et des macrocolonies isolées enchâssées dans de la matrice extracellulaire sur la surface du PE.

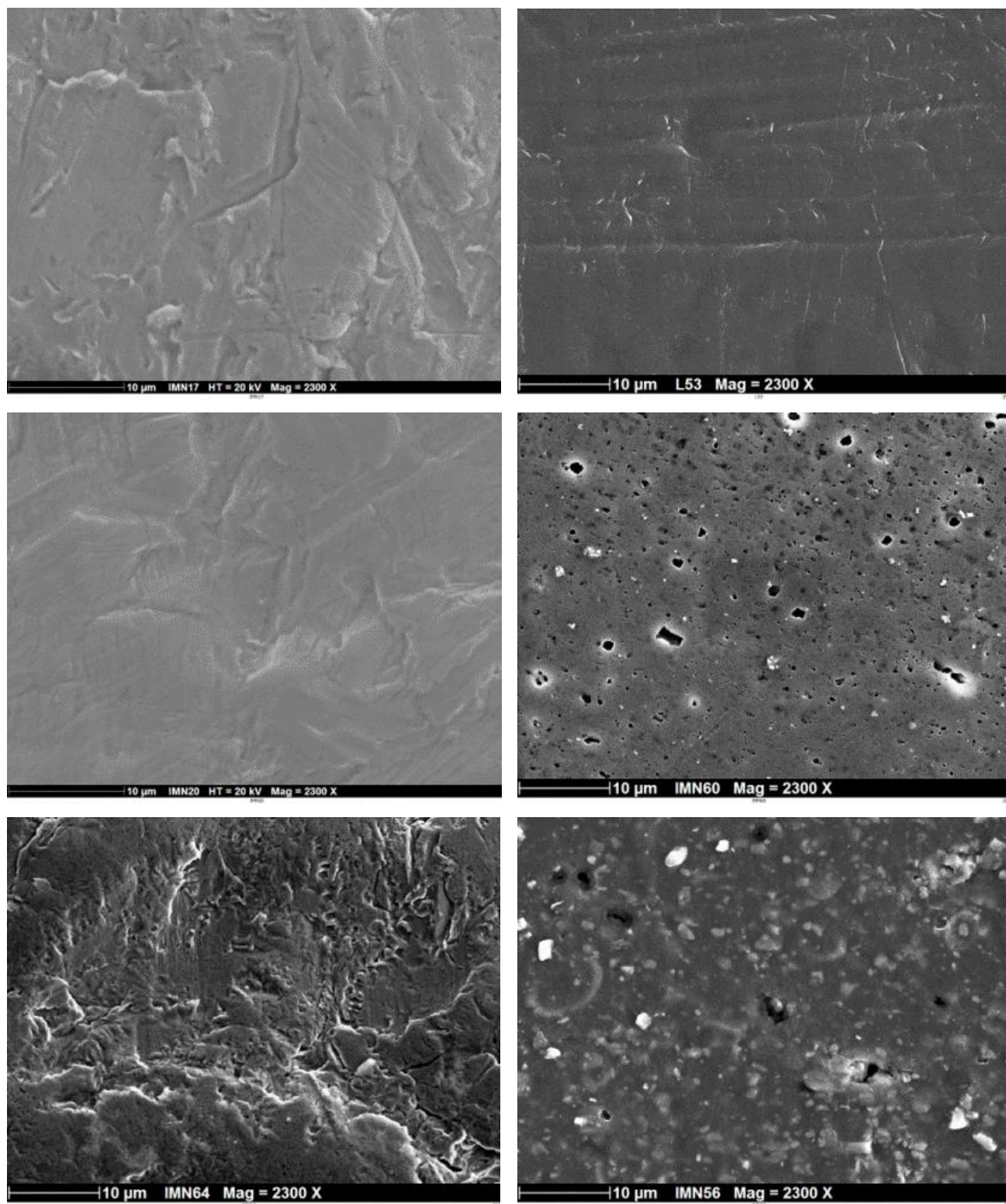


Figure 33 : Observation en microscope électronique à balayage de la surface des matériaux nus (de haut en bas : Colonne de gauche: cuivre, laiton et inox 316 L ; colonne de droite : PE, PVC-C et EPDM).

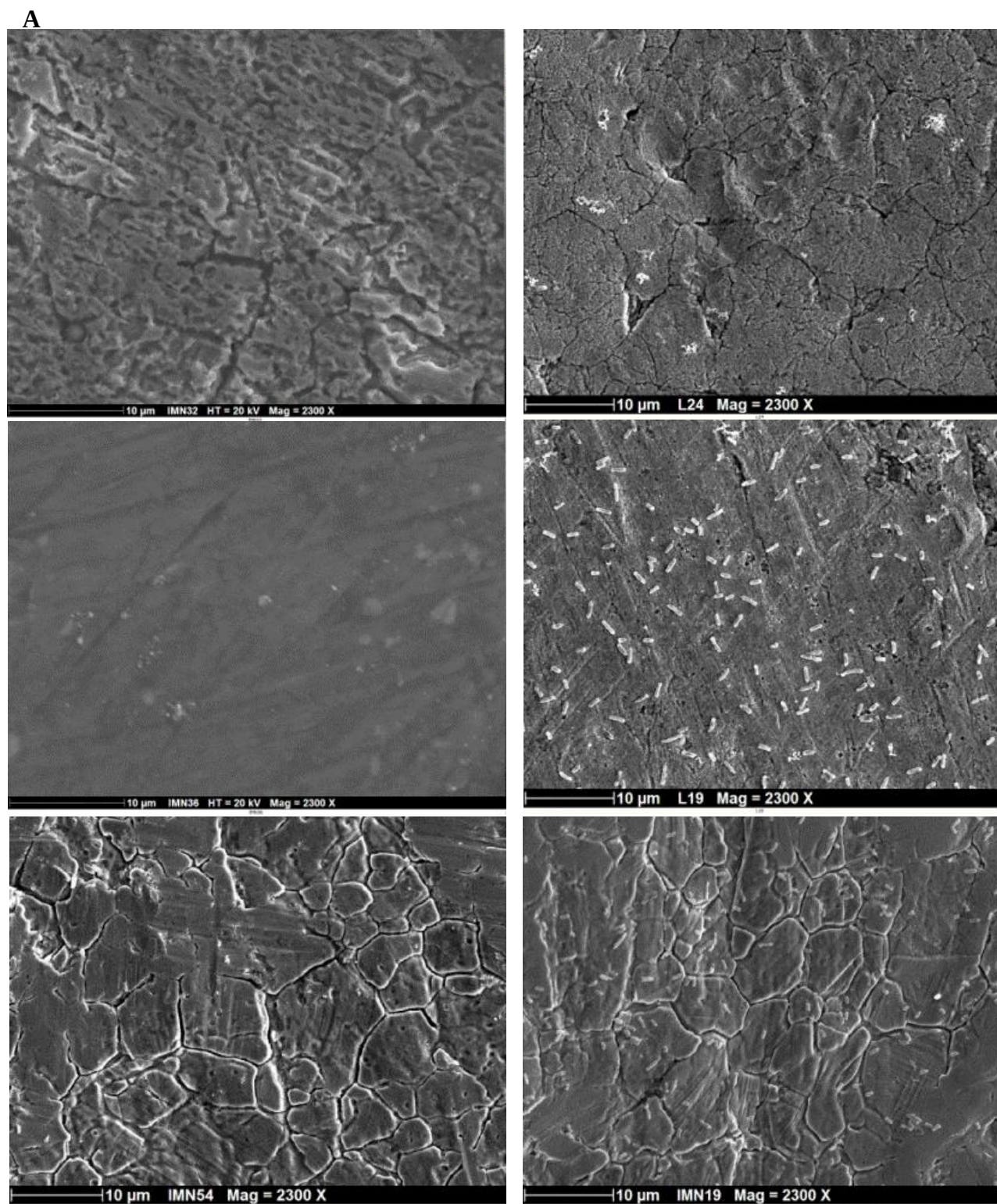


Figure 34 A : Observation en microscopie électronique à balayage des biofilms de la souche ST111 développés sur les coupons de matériaux (colonne de gauche matériau + M63F, colonne de droite matériau + M63F + souche ST111 ; de haut en bas : cuivre, laiton, inox 316 L).

B

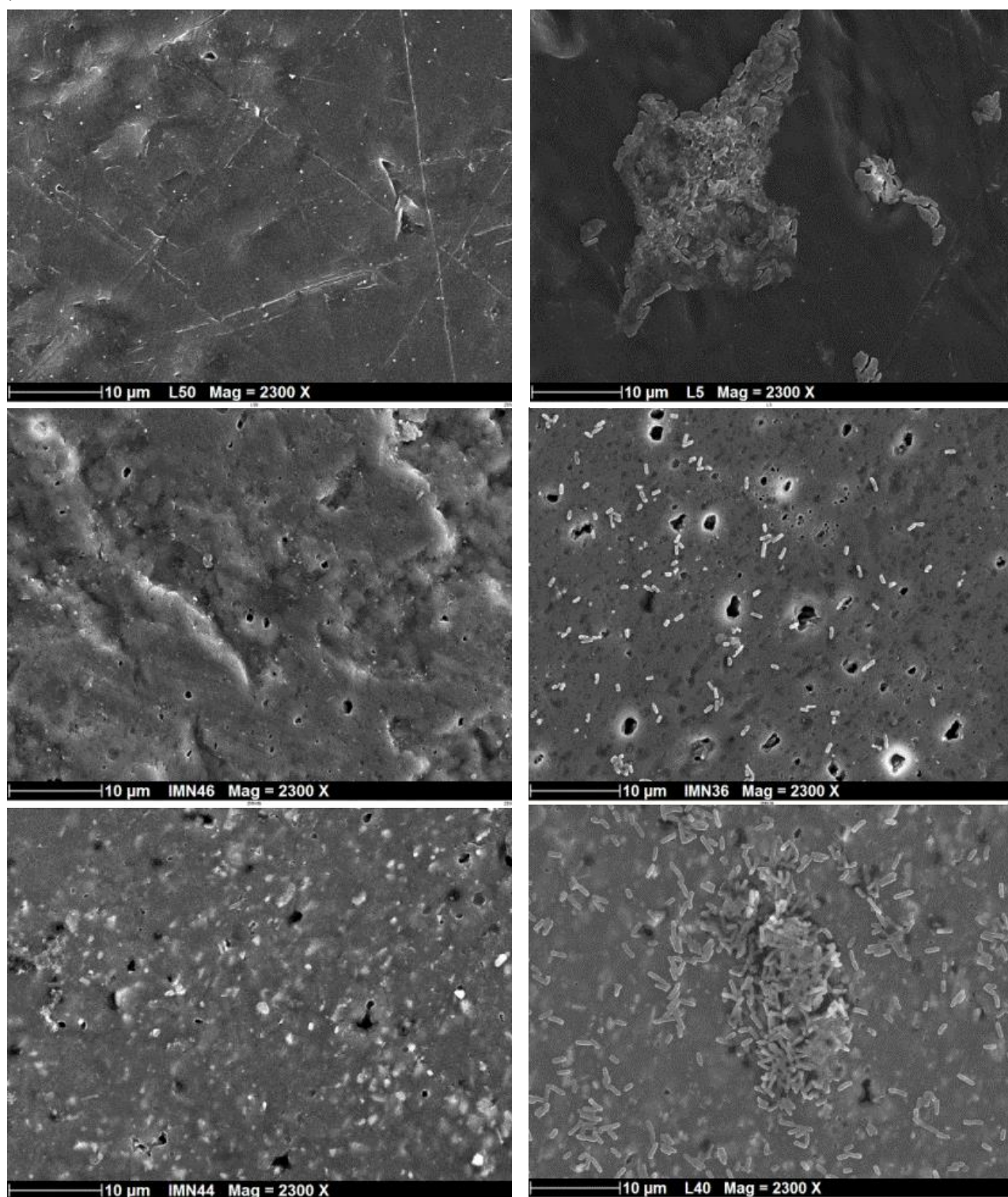


Figure 35 B :: Observation en microscopie électronique à balayage des biofilms de la souche ST111 développés sur les coupons de matériaux (colonne de gauche matériau + M63F, colonne de droite matériau + M63F + ST111) (de haut en bas : PE, PVCC et EPDM).

2. Etude de l'efficacité d'un traitement sur le biofilm de 24 h de *P. aeruginosa*.

2.1 Etude de l'efficacité du traitement à court terme : formation globale de biofilm et activité métabolique globale.

A l'issue du traitement, les valeurs de DO_{570nm} mesurées pour la plupart des matériaux sont inférieures ou égales à 0,5 excepté pour le PVC-C et l'EPDM qui présentent des valeurs plus élevées (figure 35A). Les valeurs de DO_{570nm} les plus faibles, inférieures à 0,1, ont été mesurées pour l'inox 316 L.

L'activité métabolique globale au sein des biofilms traités est inférieure ou proche de 0,3 pg/cm² pour tous les types de matériaux, excepté l'EPDM qui présente des concentrations en ATP proches de 0,5 pg/cm² (figure 35B). L'activité métabolique globale la plus faible, inférieure à 0,1 pg/cm², a été mesurée pour le cuivre.

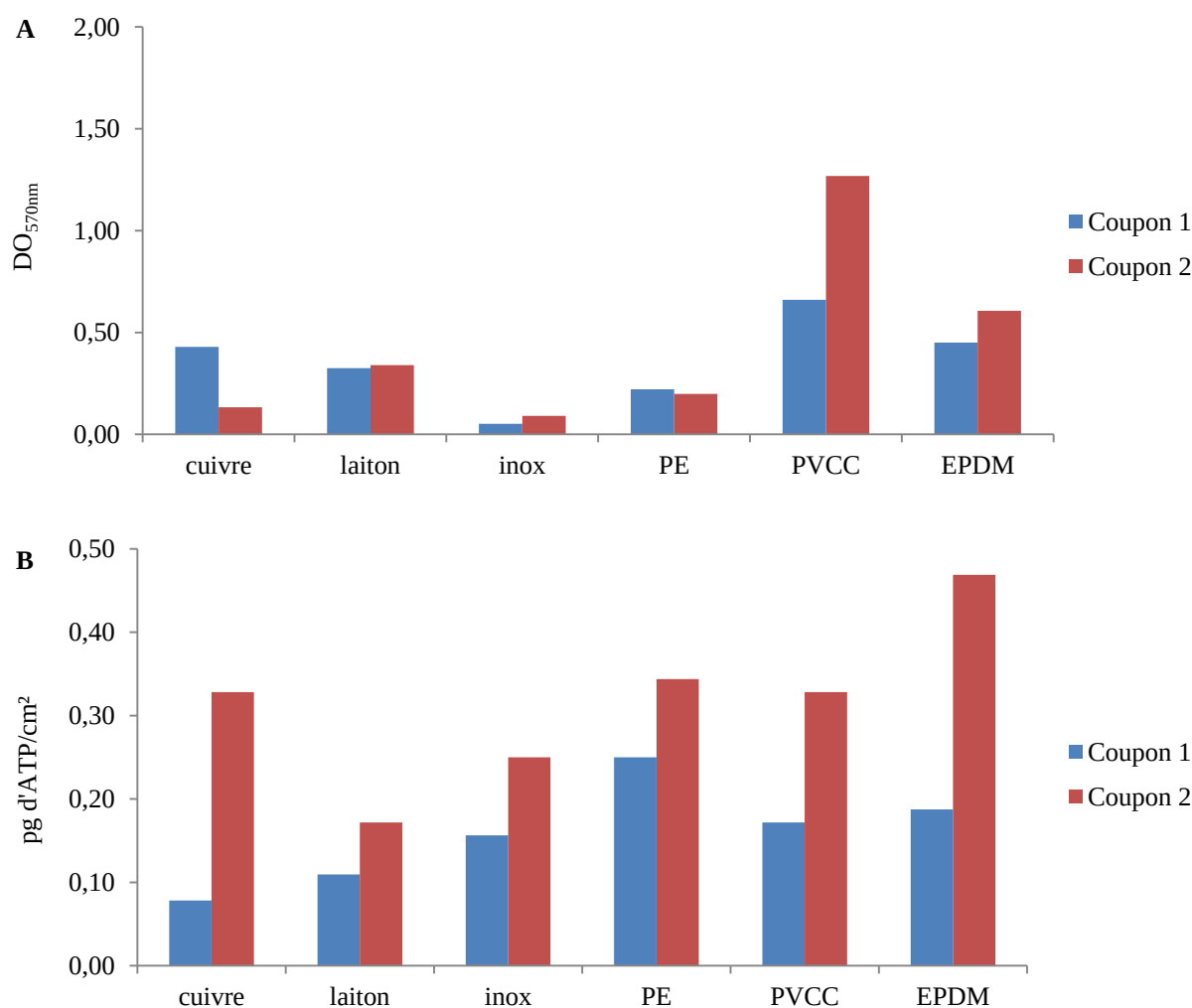


Figure 36 : Etude de l'efficacité de la séquence de nettoyage et de désinfection sur le biofilm de 24 h de la souche ST111 développé en milieu M63F : (A) mesure du biofilm globale et (B) mesure de l'activité globale au sein du biofilm.

2.1 Etude de l'efficacité du traitement à long terme : recroissance après traitement.

Pour étudier l'efficacité du traitement à long terme, la recroissance possible du biofilm sur les coupons de chacun des matériaux a été testée une semaine après traitement par mesure de la formation globale de biofilm, de l'activité métabolique globale au sein du biofilm et de la production de facteurs de virulence dans le milieu de culture au contact du matériau.

Les valeurs de DO_{570nm} mesurées sont inférieures à 0,2 pour l'inox 316 L et le laiton, proches de 0,5 pour le cuivre et supérieures à 1,0 pour le PVC-C. Les valeurs des répliquats du PE et de l'EPDM sont contradictoires (tableau 29).

Les mesures d'activité métabolique globale au sein des biofilms sont inférieures à 4 pg d'ATP/cm² pour le cuivre et le laiton (tableau 29). Les mesures liées au coupon 2 sont trois fois plus élevées que celles obtenues pour le coupon 1 dans le cas de l'inox 316 L, du PE et du PVC-C et près de sept fois plus élevées dans le cas de l'EPDM. Malgré ces différences, les valeurs mesurées pour le coupon 1 sont cohérentes avec les valeurs observées pour le coupon 2 pour l'inox 316 L, le PE et le PVC-C. Dans le cas de l'inox 316 L ces valeurs sont respectivement proches de 100 pg d'ATP/cm² et de 300 pg d'ATP/cm², dans le cas du PE et du PVC-C elles sont proches de 55 pg d'ATP/cm² pour le coupon 1 et de 300 pg d'ATP/cm² pour le coupon 2. Concernant l'EPDM, les valeurs mesurées pour le coupon 1 sont proches de 100 pg d'ATP/cm² tandis que celles relevées pour le coupon 2 sont supérieures à 500 pg d'ATP/cm².

La mesure de la production de facteurs de virulence a montré des valeurs de DO_{400nm} inférieures à 0,2 et des valeurs de DO_{691nm} inférieures à 0,01 quel que soit le matériau considéré (tableau 29).

Tableau 29 : Mesure des différents paramètres bactériens utilisés pour estimer la recroissance une semaine après traitement.

Matériau	Dénombrement de <i>P. aeruginosa</i> sur milieu sélectif	Cristal violet (DO _{570 nm})		ATP (pg/cm ²)		Pyoverdine (DO _{400 nm})		Pyocyanine (DO _{691 nm})	
		Coupon 1	Coupon 2	Coupon 1	Coupon 2	Coupon 1	Coupon 2	Coupon 1	Coupon 2
cuivre	Absence	3,28	3,22	0,01	0,01	0,563	0,625	0,072	0,488
laiton	Absence	0,42	0,34	1,32	3,45	0,193	0,092	0,103	0,072
inox	Absence	0,24	0,18	118,45	289,82	0,065	0,098	0,068	0,062
PE	Absence	0,83	0,29	55,69	293,78	0,067	0,097	0,070	0,062
PVC-C	Absence	2,12	1,99	51,31	272,38	0,223	0,094	0,070	0,061
EPDM	Absence	0,40	2,00	92,00	590,97	0,069	0,090	0,069	0,062

IV. Discussion.

Dans les réseaux de distribution d'eau thermique, plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer le développement et la persistance de biofilms de *P. aeruginosa* telles que la qualité de l'eau, la nature des matériaux constitutifs du réseau et l'efficacité des séquences de nettoyage et de désinfection. L'influence de la qualité de l'eau, et plus particulièrement de son contenu minéral naturel, sur le développement de biofilm de *P. aeruginosa* a été étudiée dans la troisième partie de ces travaux de thèse. Il a été montré qu'une condition de minéralisation élevée, caractérisée par un résidu sec à 180 °C de 1084 mg/L et une forte concentration en sulfate, défavorisait la formation du biofilm de *P. aeruginosa*. La modulation de la production de facteurs de virulence (pyoverdine et pyocyanine) en fonction de la qualité de l'eau a pu être corrélée à l'action spécifique de certains ions (partie 4). Ces éléments suggèrent que l'effet de la minéralisation sur la formation de biofilm est lié à la biodisponibilité du fer. L'étude présentée dans cette cinquième partie vient ajouter à l'étude de l'influence de la minéralisation sur la capacité de *P. aeruginosa* à développer un biofilm, l'étude de l'influence de la nature des matériaux constitutifs des réseaux de distribution d'eau thermique et l'efficacité de séquences de nettoyage et de désinfection de ces réseaux.

Dans un premier temps, l'influence de 6 matériaux (cuivre, laiton, inox 316 L, PVC-C, EPDM et PE) sur le développement du biofilm précoce d'une souche de *P. aeruginosa* a été évaluée. Dans un second temps, l'efficacité d'une séquence de nettoyage et de désinfection, utilisée pour le traitement en conditions statiques d'éléments amovibles de postes de soins d'un établissement thermal, a été testée sur des biofilms de 24 h de *P. aeruginosa* développés sur les différents matériaux évoqués ci-dessus. Pour rester dans des conditions proches de celles des réseaux d'eau thermique, l'ensemble de ces essais a été effectué en condition de minéralisation forte. L'influence des matériaux sur le développement de biofilm a été évaluée par mesure de la formation globale de biofilm, mesure de l'activité métabolique globale au sein des biofilms, observation en microscopie électronique à balayage et mesure de la production de facteurs de virulence (pyoverdine et pyocyanine). L'efficacité de la séquence de nettoyage et de désinfection a été estimée par mesure de la présence globale de biofilm et mesure de l'activité métabolique globale.

Parmi les six matériaux testés, le cuivre présente le développement de biofilm le plus faible avec peu, voir aucune, bactéries adhérentes visibles en microscopie électronique à balayage. Bien que présentant des valeurs de DO_{570nm} plus élevées, le laiton montre un développement de biofilm proche de celui du cuivre laissant supposer que l'effet d'inhibition

lié à la présence de cuivre dans le matériau est conservé à court terme malgré son alliage avec du zinc. Mehtar *et al.*, (2008) ont montré que le cuivre et plusieurs de ses alliages avec du zinc, du nickel et/ou de l'argent ont une activité antimicrobienne similaire contre des bactéries présentant une résistance à de multiples antibiotiques telles que *Klebsellia pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ils ont estimé que l'activité bactéricide du cuivre est conservée pour des alliages contenant au moins 55 % de cuivre (Mehtar *et al.*, 2008). Le laiton utilisé ici est un alliage comprenant environ 65 % de cuivre d'où la conservation de l'effet inhibiteur lié à la présence de cuivre. L'effet bactéricide des alliages de cuivre a également été démontré sur la souche de référence PAO1 par Elguindi *et al.*, (2009). L'action du cuivre est en partie attribuée à ses ions dissous présents dans l'environnement proche de la surface. La mort de la cellule bactérienne proviendrait d'une succession d'événements comprenant l'altération de l'intégrité de la membrane cellulaire, l'influx de cuivre en concentration toxique, la génération de dommages oxydatifs et la dégradation de l'ADN (Grass *et al.*, 2011). L'effet bactéricide du cuivre est favorisé dans des conditions d'humidité relativement élevées et dépend de la température (Elguindi *et al.* 2009). Ces effets tendent à être diminués par la formation naturelle d'une couche d'oxyde de cuivre épaisse à la surface des matériaux et l'exposition à des traitements inhibiteurs de corrosion (Grass *et al.*, 2011).

Dans les conditions expérimentales testées dans cette partie, seuls le cuivre et le laiton stimulent la production de pyoverdine (PVD), sidérophore agissant comme facteur de virulence, par la souche ST111. Au contact des autres matériaux, les niveaux de production de PVD sont similaires à ceux observés en culture en condition de minéralisation forte à 37 °C sous agitation (Partie 4 - III.3).

L'effet du cuivre sur la synthèse de PVD est cohérent avec les résultats rapportés dans la littérature. Teitzel *et al.* (2006) ont montré que, dans des conditions de concentrations limitées en fer, les ions Cu^{2+} stimulent la synthèse d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer dont les gènes responsables de la synthèse de PVD chez PAO1. L'ajout de 10 μM de $\text{Cu}^{2+} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans le milieu de culture double la production de PVD I par PAO1 (Braud *et al.*, 2009). Cette production est triplée lorsque 100 μM de Cu^{2+} sont ajoutés conjointement à 100 μM de Fe^{3+} (Braud *et al.*, 2010). Cette stimulation constituerait un moyen de protection contre l'effet toxique de certains ions métalliques. La PVD présente une forte affinité pour Fe^{3+} ($\log K_{\text{ML}}=29,6$) mais est susceptible de chélater d'autres ions métalliques tels que Zn^{2+} ($\log K_{\text{ML}}=19,8$), Mn^{2+} ($\log K_{\text{ML}}=17,3$) ou Cu^{2+} ($\log K_{\text{ML}}=22,3$) (Chen *et al.*, 1994). La formation d'un complexe entre la PVD et la plupart de ces métaux, dont Cu^{2+} , limite leur entrée par

diffusion dans les cellules bactériennes : bien que certains de ces complexes puissent interagir avec les récepteurs spécifiques à la ferripyoverdine, la forte affinité des mécanismes de transport ne permet qu'un import très restreint des métaux capturés autres que Fe^{3+} (Braud *et al.*, 2009).

Parmi les matériaux testés, l'inox 316 L et le PE permettent un développement de biofilm modéré avec toutefois une activité métabolique globale près de sept fois plus élevée que celle du cuivre et du laiton. Les biofilms observés en MEB sur ces deux matériaux ont un aspect totalement différent. De nombreuses bactéries isolées sont disséminées sur la surface de l'inox 316 L tandis que des colonies plus ou moins étendues sont visibles sur la surface du PE, certaines d'entre elles étant entourées de matrice extracellulaire.

L'effet du PVC-C sur la formation globale de biofilm est plus difficilement interprétable du fait de l'obtention de deux valeurs opposées. Ces mesures divergentes peuvent provenir d'une interférence entre le système de marquage au cristal violet et le matériau utilisé. Les coupons témoins de PVC-C montraient des valeurs de $\text{DO}_{570\text{nm}}$ élevées malgré l'optimisation du protocole de rinçage. Ces interférences peuvent être liées à la microstructure du PVC-C qui présente un aspect poreux sur les observations en microscopie électronique à balayage (figure 33 – III.1.3). Cette perte d'information est compensée par les mesures d'activité métabolique globale au sein du biofilm formé sur le PVC-C, dont les valeurs sont proches de celles mesurées pour l'inox 316 L et le PE.

L'EPDM est caractérisé par le plus fort développement de biofilm observé sur l'ensemble du panel de matériaux testé avec une activité métabolique globale près de 5 fois plus élevée que celle de l'inox 316 L, du PE et du PVC-C et près de 100 fois plus élevée que celle mesurée pour le cuivre ou le laiton. Le biofilm est développé sous forme de colonies comprenant de nombreuses bactéries entourées de matrice extracellulaire et de nombreux regroupements de bactéries disséminées sur la surface.

L'ensemble de ces résultats est cohérent avec les observations rapportées dans la littérature scientifique notamment en ce qui concerne le cuivre particulièrement connu pour ces propriétés inhibitrices. Lehtola *et al.* (2004) ont ainsi montré que le développement de biofilm d'eau potable sur le cuivre était moins rapide que sur le PE, bien que cet effet ne soit plus visible après 200 jours. Les effets opposés du cuivre et de l'EPDM sur le développement de biofilm ont été décrits dans la littérature pour le développement de biofilm d'eau potable de 14 jours et l'intégration de *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila* et *Enterobacter nimipressuralis* dans ces biofilms préétablis (Moritz *et al.*, 2010). Il a également été montré qu'après 90 jours de développement le potentiel de formation d'un biofilm d'eau potable était plus faible pour le

cuivre (30 pg d'ATP/cm²), que pour le PE, le PVC-C et l'inox 316 L, ces matériaux offrant un potentiel de formation de biofilm similaire compris entre 100 et 160 pg d'ATP/cm² (Yu *et al.*, 2010).

Ces résultats montrent une plus forte tendance des matériaux organiques à promouvoir le développement de biofilm. Cet effet a notamment été attribué à l'irrégularité de leur surface, cette rugosité étant susceptible de jouer un rôle déterminant dans l'adhésion bactérienne. Dans cette étude, l'aspect géométrique de certaines des colonies développées sur le PE laisse penser que les bactéries ont préférentiellement adhéré au niveau de certaines irrégularités de la surface du matériau (figure 37).

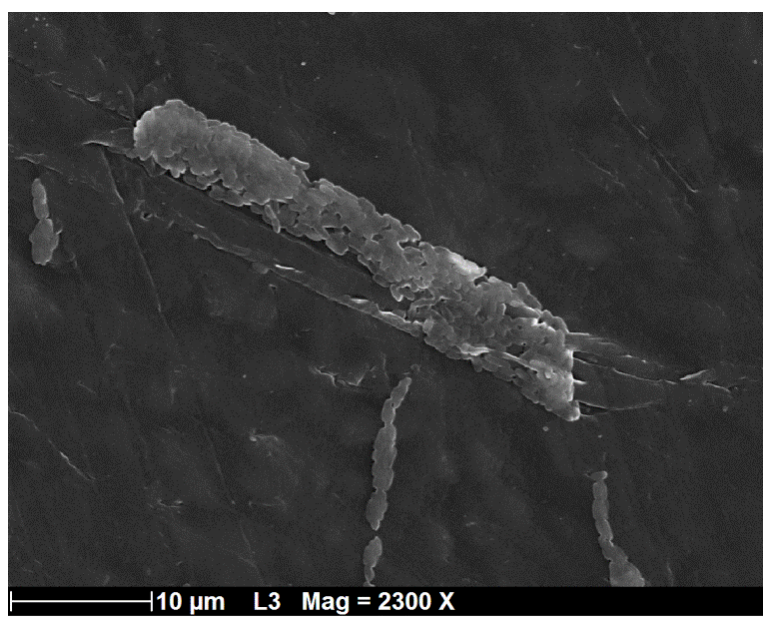


Figure 37 : Observation en microscopie électronique à balayage d'une colonie de ST111 développée sur la surface d'un coupon PE après 24 h d'incubation à 30 °C en M63F.

Les irrégularités de surface dont la taille est proche ou supérieure à celle des bactéries favoriseraient leur implantation (Anselme *et al.*, 2010 ; Bazaka *et al.*, 2011 ; Bohinc *et al.*, 2014) en augmentant la surface d'adhésion disponible, en offrant une protection contre les forces d'arrachements et en augmentant la convection de transport de masse (Anselme *et al.*, 2010). Oh *et al.* (2009) montrent que parmi quatre matériaux testés (propylène, aluminium, fer et caoutchouc), le propylène montre la plus forte rugosité de surface et le plus fort développement de biofilm de *P. aeruginosa*. Les irrégularités de plus petites tailles restreindraient la capacité des bactéries à les détecter et à interagir avec elles (Anselme *et al.*, 2010). Hilbert *et al.* (2003) montrent que l'adhésion d'une souche de *P. aeruginosa* est inchangée sur un inox dont la rugosité de surface de 0,9 μm est abaissée à 0,01 μm. L'effet de la rugosité de surface sur la modulation des capacités d'adhésion des bactéries est controversée,

certaines études suggérant une influence plus significative de la composition chimique de la surface des matériaux (Anselme *et al.*, 2010). Les matériaux organiques sont connus pour leur tendance à libérer des molécules biodégradables de faible poids moléculaire, susceptibles d'être une source de nutriments pour les microorganismes. Ces molécules proviennent des additifs utilisés dans les processus de fabrication des matériaux organiques tels que des antioxydants, des lubrifiants, des stabilisateurs ou des plastifiants (Moritz *et al.*, 2010). Lehtola *et al.* (2004) ont montré qu'un PE neuf libérait du carbone organique assimilable (AOC) uniquement pendant son premier jour de mise en eau et du phosphore microbiologiquement assimilable (MAP) jusqu'à 20 jours après sa première mise en eau (Lehtola *et al.*, 2004).

Les disparités de développement de biofilm observées selon la nature du matériau considéré sont susceptibles d'avoir un impact significatif sur l'efficacité des séquences de nettoyage et de désinfection des réseaux de distribution d'eau. La présence d'irrégularités sur la surface des matériaux et/ou l'augmentation de la production de matrice extracellulaire peuvent fournir une protection aux bactéries contre les attaques chimiques, mécaniques ou thermiques. A l'issue de la séquence de nettoyage et de désinfection, la présence globale de biofilm, mise en évidence par le marquage au cristal violet, est divisée par deux à trois pour le PVC-C et l'EPDM, est augmentée pour le cuivre et n'est pas diminuée pour le laiton, l'inox et le PE. A l'inverse l'activité métabolique globale au sein du biofilm est pratiquement nulle ($<0,5$ pg d'ATP/cm²) quel que soit le matériau considéré. Ces résultats suggèrent que les produits utilisés ont atteint et éliminé les populations actives de *P. aeruginosa* présentes au sein des biofilms mais n'ont pas pu décrocher la matrice extracellulaire et/ou les débris cellulaires restés adhérents après traitement. Toté *et al.* (2010) ont montré qu'un certain nombre de biocides ont un effet inhibiteur significatif sur les cellules métaboliquement actives au sein des biofilms de 24 h de *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* mais une action limitée sur leur matrice extracellulaire. Seuls les oxydants forts tel que l'hypochlorite de sodium ont une action à la fois sur les bactéries actives et la matrice extracellulaire (Toté *et al.*, 2010).

L'efficacité de la séquence de traitement a été attestée à plus long terme par un essai de recroissance une semaine après traitement. La recroissance observée n'est pas due à *P. aeruginosa* mais à la flore autochtone de l'eau potable utilisée pour les rinçages. L'absence de *P. aeruginosa* est suggérée par l'absence de production de pyoverdines et a été confirmée par étalement sur milieu sélectif des cultures au contact des coupons. A l'inverse du cuivre et du laiton, le développement de biofilm de la flore autochtone de l'eau potable a été favorisé sur l'inox 316 L et sur les matériaux organiques. La matrice extracellulaire restante après traitement

est susceptible d'avoir participé à cette recolonisation en offrant des points d'ancrage supplémentaires aux microorganismes colonisateurs.

Les résultats obtenus ici sont valables pour un biofilm de *P. aeruginosa* âgé de 24 h et développé en conditions optimales contrôlées. L'influence des matériaux observée sur le biofilm jeune de *P. aeruginosa* peut ne plus être observée à plus long terme, à l'exemple du cuivre cité précédemment dont l'effet sur le biofilm d'eau potable s'atténue après 200 jours d'incubation. De la même façon, la séquence de nettoyage et de désinfection testée ici peut ne pas avoir la même efficacité sur un biofilm mature. La séquence de traitement testée n'intégrait pas le nettoyage mécanique (brossage et grattage) des pièces démontables de poste de soins qui peut être réalisé en pratique au cours du nettoyage et de la désinfection. Il faut également prendre en compte le niveau de complexité du biofilm : les essais ont été menés sur un biofilm dit mono-espèce, produit par une souche de *P. aeruginosa*. Dans l'environnement les biofilms sont des communautés complexes reposant sur de multiples interactions entre les différents microorganismes présents, qu'il s'agisse de la flore autochtone de l'eau thermale ou de l'eau potable de rinçage comme des microorganismes pathogènes potentiellement présents.

Conclusions et Perspectives

Les eaux minérales naturelles se caractérisent par leur contenu en sels minéraux et leur concentration en éléments traces. Leur composition, dépendante de leur origine géochimique, est très variable d'une source à l'autre. Cette spécificité oriente leur usage thérapeutique, ce dernier s'effectuant sous contrôle médical en établissements thermaux. Les eaux minérales naturelles, règlementairement définies comme des eaux microbiologiquement saines, doivent conserver leur qualité initiale tout au long de leur exploitation. Les textes de loi exigent ainsi l'absence de microorganismes pathogènes de l'émergence aux points d'usage. Toute non-conformité est sanctionnée par la fermeture du point d'usage concerné si la contamination est localisée ou de la totalité de l'établissement thermal si la contamination est plus étendue et récurrente. Le maintien de la qualité microbiologique de l'eau est obtenu par le seul traitement des réseaux en dehors des plages d'utilisation par les curistes, la présence de résiduel de produit de désinfection dans l'eau thermale étant prohibée. Le traitement des réseaux de distribution comprend une étape de nettoyage qui permet l'élimination des incrustations et des dépôts. Ces derniers comprennent une partie minérale, dépendante de la composition de l'eau, et une partie organique, essentiellement composée de la flore autochtone de l'eau thermale adhérente à la surface des matériaux sous forme de biofilms. Afin d'éviter l'implantation et la prolifération de microorganismes pathogènes au sein des biofilms, l'étape de nettoyage est suivie d'une étape de désinfection. Malgré l'application de mesures de nettoyage et de désinfection de façon préventive ou curative, les réseaux de distribution d'eaux minérales naturelles demeurent vulnérables aux contaminations microbiologiques. Un rapport de la Direction Générale de la Santé établit que plus de 80 % des établissements thermaux français ont été contaminés au moins une fois par un agent pathogène au cours d'une saison thermale et que *P. aeruginosa* est incriminée dans plus de deux tiers des cas.

Cette bactérie est un pathogène opportuniste qui ne présente pas de risque pour la population générale mais qui est impliqué dans de nombreuses infections chez les personnes fragilisées, immunodéprimées ou chez les grands-brûlés. La présence de *P. aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau potable a été associée à plusieurs reprises à des épisodes épidémiques dans des unités de soins intensifs. Cette bactérie possède d'importantes capacités d'adaptation et de survie notamment liées à sa plasticité génomique et sa versatilité métabolique. Elle présente également une résistance naturelle ou acquise à de nombreuses substances actives tels que les antibiotiques et les antiseptiques. Son pouvoir pathogène repose sur sa capacité à synthétiser de nombreux facteurs de virulence associés à la surface de la cellule ou sécrétés dans l'environnement. Ces facteurs contribuent également à l'implantation de la bactérie dans l'environnement sous forme de biofilms.

Les biofilms sont définis comme des populations de microorganismes adhérentes à une surface biotique ou abiotique et entourées d'une matrice extracellulaire. Leur développement répond à un cycle de vie comprenant plusieurs étapes clés essentiellement illustrées par la reconnaissance d'une surface, l'adhésion, la maturation et la dispersion. Le déroulement des premières étapes de reconnaissance et d'adhésion repose sur des interactions physicochimiques (passives) puis biologiques (actives) s'établissant entre la surface et la bactérie. Les étapes de maturation sont marquées par l'augmentation de la synthèse des éléments constitutifs de la matrice extracellulaire puis par l'organisation et la structuration de celle-ci et par l'apparition des canaux d'import/export. Le biofilm prend un aspect tridimensionnel complexe caractérisé par la formation de structures dites « champignons ». L'évolution de la structure de la matrice au cours de la formation du biofilm conduit à la création de gradients d'éléments indispensables au métabolisme bactérien ou des déchets qui en sont issus. Ces gradients sont à l'origine de la formation de niches écologiques sélectionnant les espèces ou les sous-populations adaptées à ces microenvironnements. L'hétérogénéité métabolique des populations et les éléments constitutifs de la matrice extracellulaire participent à l'augmentation de la résistance des microorganismes aux biocides utilisés pour désinfecter les réseaux.

La conception et l'exploitation des réseaux de distribution d'eau minérale naturelle sont conditionnées par le contenu minéral de l'eau circulante et les orientations thérapeutiques définies, par les différences de température existant entre l'eau à l'émergence et l'eau utilisée au niveau du poste soin et par le régime hydraulique imposé par la disponibilité de la ressource. L'ensemble de ces facteurs est susceptible d'influencer la formation et le développement de biofilm. Pour autant, peu de données permettant d'expliquer la vulnérabilité des réseaux de distribution d'eau thermale aux contaminations microbiologiques, et notamment aux contaminations par *P. aeruginosa*, sont disponibles.

L'objectif de ces travaux de thèse était d'apporter des éléments de compréhension sur le comportement de *P. aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau minérale naturelle afin de mieux comprendre les facteurs qui influencent son implantation et sa persistance, et de valider l'efficacité de produits de traitement.

Pour étudier l'influence de la minéralisation de l'eau sur le comportement de *P. aeruginosa*, trois eaux minérales naturelles embouteillées ont été choisies suivant la valeur de leur résidu sec à 180 °C de façon à représenter trois niveaux de minéralisation dits faible (130 mg/L), moyen (309 mg/L) et fort (1084 mg/L). L'influence du contenu minéral de ces eaux sur les capacités d'un panel de neuf souches d'origine diverse à former du biofilm a été

étudiée. Les résultats mettent en évidence des comportements hétérogènes dépendants de la souche considérée. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par la diversité génétique naturelle des souches testées et/ou par les pressions de sélection liées à l'environnement d'isolement des souches, le panel testé comprenant la souche de référence PAO1, sept souches isolées d'eau potable ou d'eau thermale et une souche clinique. Les résultats obtenus ont également montré que plus le niveau de minéralisation est élevé plus les capacités des souches à former du biofilm sont faibles. Un effet de la minéralisation sur la charge globale des cellules bactériennes a été observé, ainsi, plus la minéralisation de l'eau est forte plus la valeur absolue du potentiel zêta est faible. Cet effet peut résulter de l'adsorption de cations à la surface des cellules bactériennes chargées négativement. Cependant, il ne suffit pas à expliquer les différences de biofilm observées selon les conditions de minéralisation et suggère l'implication de mécanismes actifs dépendant de l'activité bactérienne.

L'influence de la minéralisation sur les principaux mécanismes bactériens impliqués dans la formation de biofilm a été étudiée. Contrairement à l'hypothèse de départ, la minéralisation ne semble pas agir sur les différents types de mobilité de *P. aeruginosa*, ni sur la synthèse des trois principaux exopolysaccharides produits par la bactérie, l'alginate, le Pel et le Psl. En revanche, une influence significative du contenu minéral des eaux a été observée sur la synthèse de deux pigments bactériens agissant comme facteurs de virulence : la pyoverdine (PVD) et la pyocyanine (PCN). Plus la minéralisation est élevée plus la production de PVD est élevée et plus la production de PCN est faible. L'effet spécifique de certains ions sur la synthèse de PVD a pu être souligné par les tests statistiques. Ainsi les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- favorisent cette production tandis que les ions Na^+ , K^+ et NO_3^- la défavorisent. Ces résultats suggèrent que l'effet de la minéralisation sur la production de biofilm est lié à la biodisponibilité du fer qui serait, selon les conditions, plus ou moins complexé par les anions Cl^- , SO_4^{2-} et HCO_3^- . En minéralisation moyenne et forte, le fer serait complexé par ces anions, et, afin d'assurer son approvisionnement, la bactérie privilégierait la synthèse de PVD qui présente une forte affinité pour le fer. En minéralisation faible, le fer serait relativement disponible et la bactérie privilégierait la capture du fer en associant le mode d'action de la PCN à celui d'un second sidérophore, la pyochéline. Cette dernière présente une plus faible affinité pour le fer que la PVD mais sa synthèse est moins coûteuse en énergie. La PCN sécrétée à l'extérieur de la cellule réduit le fer de sa forme Fe^{3+} à sa forme Fe^{2+} et facilite son assimilation. De plus, l'oxydation de la PCN génère une augmentation du stress oxydatif qui favorise la lyse cellulaire et la libération d'ADN extracellulaire (ADNe). Les interactions physiques qui s'établissent entre la PCN et l'ADNe favorisent la fixation de ce dernier à la surface des cellules

bactériennes, ce qui augmente l'agrégation des cellules et accroît ainsi la formation de biofilm en minéralisation faible.

Il a été choisi dans ce travail, d'évaluer l'aptitude des matériaux à favoriser la formation de biofilm jeune de *P. aeruginosa* dans des conditions de minéralisation imposées. Les résultats obtenus concordent avec ce qui est généralement observé pour des biofilms d'eau potable. Les matériaux métalliques ont tendance à défavoriser la formation de biofilm au contraire des matériaux organiques. L'efficacité d'une séquence de nettoyage et désinfection utilisée dans un établissement thermal a été évaluée spécifiquement sur des biofilms de *P. aeruginosa* présents sur différents matériaux. Les produits de traitement utilisés selon leur condition d'application en établissement thermal ont éliminé aussi efficacement les populations actives de *P. aeruginosa* présentes sur les matériaux métalliques et les matériaux organiques. En revanche, l'action des traitements ne permet pas d'éliminer la totalité de la matrice extracellulaire et des débris cellulaires. L'efficacité de la séquence de traitement a été attestée à plus long terme en vérifiant l'absence de recroissance de *P. aeruginosa*. Cependant, la flore autochtone de l'eau potable utilisée pour les rinçages a été capable d'adhérer et de former un biofilm métaboliquement actif. La matrice extracellulaire restante après traitement est susceptible d'avoir participé à cette recolonisation en offrant des points d'ancrage supplémentaires aux microorganismes colonisateurs. Une attention particulière doit donc être portée à la qualité de l'eau utilisée pour appliquer les traitements et rincer les réseaux lorsqu'il ne s'agit pas d'eau thermale.

A travers ce travail, nous avons souligné la complexité des interactions entre *P. aeruginosa* et son environnement et montré leurs rôles dans l'implantation de la bactérie sous forme de biofilm. Les expérimentations ont été réalisées en laboratoire dans des conditions expérimentales définies pour appréhender le comportement de neuf souches de *P. aeruginosa* dans un environnement minéral complexe. Bien qu'il soit difficile d'extraire des conclusions directement applicables à la gestion des réseaux, certains des outils utilisés dans ces travaux, notamment la méthode de typage des souches et les modèles de biofilm, peuvent contribuer à améliorer la lutte contre les contaminations par *P. aeruginosa*.

Ainsi, il nous semblerait pertinent de coupler l'utilisation d'une méthode de typage à l'utilisation de la méthode de détection NF EN ISO 16266 pour déterminer si une contamination est récurrente ou ponctuelle et pour en identifier l'origine. A titre d'exemple, la détection ponctuelle de souches de profils MLVA différents peut suggérer des contaminations épisodiques de l'eau sans qu'il y ait nécessairement une implantation au sein d'un biofilm et

Conclusions et perspectives

attester que les mesures de nettoyage et désinfection couramment utilisées sont suffisamment efficaces pour enrayer la contamination. A l'inverse, la détection récurrente de souches de même profil peut être le signe d'une contamination bien établie dans une zone plus ou moins étendue du réseau. Dans ce cas de figure, il est essentiel de localiser précisément la zone de développement du biofilm pour remplacer un tronçon de canalisation contaminé et appliquer un traitement plus ciblé et plus adapté à un biofilm complexe.

De la même façon, l'utilisation de modèles de biofilms développés dans des conditions de minéralisation complexe pourrait être envisagée pour valider l'efficacité de biocides spécifiquement appliquées au nettoyage et à la désinfection des réseaux d'eau thermale et des postes de soins.

Bibliographie

Agence National de la Santé et de la Sécurité alimentation, environnement, travail, 2010. Evaluation des rsiques sanitaires liés à l'exposition par l'ingestion de *Pseudomonades* dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées). Rapport, Octobre 2010, Edition scientifique, 85 p.

Allen M. J. et Geldreich E. E., 1975. Bacteriological criteria for ground-water quality. *Ground Water*, 13(1): 45-52.

Allen W. J., Phan G., Waksman G., 2012. Pilus biogenesis at the outer membrane of gram-negative bacterial pathogens. *Current Opinion In Structural Biology*, 22: 500-506, doi:10.1016/j.sbi.2012.02.001.

Allesen-Holm M., Barken K. B., Yang L., Klausen M., Webb J. S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59(4): 1114-1128, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x.

An Y. H. et Friedman R. J., 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 43: 338-348.

Anderson J. K., Smith T. G., Hoover T. R., 2010. Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *TRENDS in microbiology*, 18(1): 30, doi:10.1016/j.tim.2009.11.001.

Anselme K., Davidson P., Popa A. M., Giazson M., Liley M., Ploux L., 2010. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale. *Acta Biomaterialia*, 6: 3824-3846, doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.001.

Arai H., 2011. Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 2: article 103, doi: 10.3389/fmicb.2011.00103.

Association Française de NORmalisation, 1998, NF EN 1652, Cuivre et alliages de cuivre, plaques, tôles, bandes et disques pour usages généraux. Norme, France, 44 p.

Association Française de NORmalisation, 2005. NF EN ISO 17294-2, Qualité de l'eau, application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS), partie 2 : dosage de 62 éléments. Norme, France, 36 p (norme faisant l'objet d'un projet de révision).

Association Française de NORmalisation, 2008. NF EN ISO 16266, Qualité de l'eau, Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*, méthode par filtration sur membrane. Norme, France, 24 p.

Bibliographie

Association Française de NORmalisation, 2010. NF EN 1057 + A1, Cuivre et alliages de cuivre, tubes ronds sans soudure en cuivre pour l'eau et le gaz dans les applications sanitaires et de chauffage. Norme, France, 36 p.

Association Française de NORmalisation, 2013. NF DTU 60.11 P1-1, Travaux de bâtiment — Règles de calcul des installations de plomberie sanitaire et d'eaux pluviales — Partie 1-1 : Réseaux d'alimentation d'eau froide et chaude sanitaire. Norme, France, 16 p.

Association Française de NORmalisation, 2013. NF DTU 60.11 P1-2, Travaux de bâtiment — Règles de calcul des installations de plomberie sanitaire et d'eaux pluviales — Partie 1-2 : Conception et dimensionnement des réseaux bouclés. Norme, France, 17 p.

Banin E., Vasil M. L., Greenberg E. P., 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. PNAS, 102(31): 11076-11081, doi: 10.1073/pnas.0504266102.

Barken K. B., Pamp S. J., Yang L., Gjermansen M., Givskov M., Whitchurch C. B., Engel J. N., Tolker-Nielsen T., 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environmental Microbiology, 10(9): 2331-2343, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x.

Barraud N., Hassett D. J., Hwang S.-H., Rice S. A., Kjelleberg S., Webb J. S., 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 188(21): 7344-7353, doi:10.1128/JB.00779-06.

Barraud N., Schleheck D., Klebensberger J., Webb J. S., Hassett D. J., Rice S. A., Kjelleberg S., 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels and enhanced dispersal. Journal of Bacteriology, 191(23): 7333-7342, doi: 10.1128/JB.00975-09.

Bazaka K., Crawford R. J., Ivanova E. P., 2011. Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness? Biotechnology Journal, 6: 1103-1114, doi: 10.1002/biot.201100027.

Beare P. A., For R. J., Martin L. W., Lamont I. L., 2003. Siderophore-mediated cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. Molecular Microbiology, 47(1): 195-207.

Bédard E., Charron D., Lalancette C., Déziel E., Prévost M., 2014. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 356(2): 226-234, doi: 10.1111/1574-6968.12494.

Beier D. et Gross R., 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. Current Opinion in Microbiology, 9: 143-152, doi: 10.1016/j.mib.2006.01.005.

Berlutti F., Morea C., Battistoni A., Sarli S., Cirpiani P., Superti F., Ammendolia M. G., Valenti P., 2005. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of

Pseudomonas aeruginosa and *Burkholderia cenocepacia*. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 18(4): 661-670.

Bernier S. P., Ha D.-G., Khan W., Merritt J. H., O'Toole G. A., 2011. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. Research in Microbiology, 162(7): 680-688, doi: 10.1016/j.resmic.2011.04.014.

Berthelot P., Grattard F., Mahul P., Pain P., Jospé R., Venet C., Carricajo A., Aubert G., Ros A., Dumont A., Lucht F., Zéni F., Auboyer C., Bertrand J.-C., Pozzetto B., 2001. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. Intensive Care Medicine, 27(3): 503-512.

Bertrand X., Slekovec C., Cholley P., Talon D., 2011. Epidemiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Revue Francophone des Laboratoires, 435 : 35-40.

Blanc D. S., Francioli P., Zanetti G., 2007. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care units – a review. The Open Microbiology Journal, 1: 8-11.

Blanc D. S., Nahimana I., Petignat C., Wenger A., Bille J., Francioli P., 2004. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. Intensive Care Medicine, 30(10): 1964-1968.

Blankenfeldt W. et Parsons J. F., 2014. The structural biology of phenazine biosynthesis. Current Opinion in Structural Biology, 29: 26-33, doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.013.

Blus-Kadosh I., Zilka A., Yerushalmi G., Banin E., 2013. The effect of pstS and phoB on quorum sensing swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE, 8(9): e74444, doi: 10.1371/journal.pone.0074444.

Bohinc K., Drazic G., Fink R., Oder M., Jevsnik M., Nipic D., Godic-Torkar K., Raspor P., 2014. Available surface dictates microbial adhesion capacity. International Journal of Adhesion & Adhesives, 50: 265-272, doi: 10.1016/j.ijadhadh.2014.01.027.

Boisseuil D., 2002. Le thermalisme en Toscane à la fin du moyen-âge : *les bains siennois de la fin du XIII^e siècle au début du XVI^e siècle*. Rome : Publications de l'Ecole française de Rome, 534 p. (Collection de l'Ecole française de Rome, 295) ISBN : 9782728305742.

Bordi C. et de Bentzmann S., 2011. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. Annals of Intensive Care, 1:19, doi: 10.1186/2110-5820-1-19.

Borlee B. R., Goldman A. D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D. J., Parsek M. R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesion to reinforce the biofilm extracellular matrix. Molecular Microbiology, 75(4): 827-842, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.

Borriello G., Werner E., Roe F., Kim A. M., Ehrlich G. D., Stewart P. S., 2004. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7): 2659-2664, doi: 10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004.

Bottoni P., Ovari M., Zaray G., Caroli S., 2013. Characteristics of spring waters in Budapest: a short review. *Microchemical Journal*, 110: 770-774, doi: 10.1016/j.microc.2013.09.002.

Bou R., Aguilar A., Perpignan J., Ramos P., Peris M., Lorente L., Zuniga A., 2006. Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections related to a flexible bronchoscope. *Journal of Hospital Infection*, 64: 129-135, doi: 10.1016/j.jhin.2006.06.014.

Braud A., Geoffroy V., Hoegy F., Mislin G. L. A., Schalk I. J., 2010. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3): 419-425.

Braud A., Hoegy F., Jezequel K., Lebeau T., Schalk I. J., 2009. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology*, 11(5): 1079-1091.

Braun V., 2001. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291: 67-79.

Breidenstein A. B. M., de la Fuente-Nunez C., Hancock R. E. W., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *TRENDS in Microbiology*, 19(8): 419-426, doi:10.1016/j.tim.2011.04.005.

Bremer P. J., Fillery S., McQuillan A. J., 2006. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 254-262, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004.

Bremer P. J., Fillery S., McQuillan A. J., 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 254-262, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004.

Bridier A., Briandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F., 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9): 1017-1032, doi: 10.1080/08927014.2011.626899.

Britigan B. E., Roeder T. L., Rasmussen G. T., Shasby D. M., McCormick M. L., Cox M. D., 1992. Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to epithelial cells. *The journal of Clinical Investigation*, 90: 2187-2196.

Bibliographie

- Brousseau N., Lévesque B., Guillemet T., Gauvin D., Giroux J.-P., Cantin P., Gingras S., Laverdière D., 2009. Etude de la contamination microbiologique de spas publics au Québec. Institut national de santé publique du Québec, Canada, 107 p.
- Buck A. C. et Cooke E. M., 1969. The fate of ingested *Pseudomonas aeruginosa* in normal persons. *Journal of Medical Microbiology*, 2: 521-525.
- Burrows L. L., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review in Microbiology*, 66: 493-520, doi:10.1146/annurev-micro-092611-150055.
- Busch A. et Waksman G., 2012. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 367: 1112-1122, doi:10.1098/rstb.2011.0206.
- Busscher H. J. et van der Mei H. C., 2006. Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1): 127-141, doi: 10.1128/CMR.19.1.127-141.2006.
- Byrd M. S., Sadovskaya I., Vinogradov E., Halping L., Sprinkle A. B., Richardson S. H., Ma L., Ralston B., Parsek M. R., Anderson E. M., Lam J. S., Wozniak D. J., 2009. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73(4): 622-638, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x.
- Caiazza N. C., Merritt J. H., Brothers K. M., O'Toole G. A., 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(9): 3603-3612, doi: 10.1128/JB.01685-06.
- Casanovas-Massana A., Blanch A. R., 2012. Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 38-44, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.012.
- Casino P., Rubio V., Marina A., 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 20: 763-771, doi: 10.1016/j.sbi.2010.09.010.
- Chambers J. R. et Sauer K., 2013. Small RNAs and their role in biofilm formation. *TRENDS in Microbiology*, 21(1): 39-49, doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.008.
- Chandy J. P. et Angles M. L., 2001. Determination of the nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Research*, 35(11): 2677-2682.
- Chen M.-Y., Chen M.-J., Lee P.-F., Cheng L.-H., Huang L.-J., Lai C.-H., Huang K.-H., 2010. Towards real-time observation of conditioning film and early biofilm formation under laminar flow conditions using a quartz crystal microbalance. *Biochemical Engineering Journal*, 53: 121-130, doi: 10.1016/j.bej.2010.10.003.

Chen Y., Jurkevitch E., Bar-Ness E., Hadar Y., 1994. Stability constant of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Science Society of America Journal*, 58(2): 390-396, doi: 10.2136/sssaj1994.03615995005800020021x.

Chew S. C., Kundukad B., Seviour T., van der Maarel J. R. C., Yang L., Rice S. A., Doyle P., Kjelleberg S., 2014. Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. *mBio*, 5(4): e01536-14, doi: 10.1128/mBio.01536-14.

Chiang W.-C., Nilsson M., Jensen P. O., Hoiby N., Nielsen T. E., Givskov M., Tolker-Nielsen T., 2013. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5): 2352-2361, doi: 10.1128/AAC.00001-13.

Cholley P., Thouverez M., Floret N., Bertrand X., Talon D., 2008. The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Medicine*, 34: 1428-1433, doi: 10.1007/s00134-008-1110-z.

Chrzanowski L., Lawniczak L., Czaczyk K., 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 401-419, doi: 10.1007/s11274-011-0854-8.

Cobessi D., Celia H., Pattus F., 2005. Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 352: 893-904, doi: 10.1016/j.jmb.2005.08.004.

Colvin K. M., Gordon V. D., Murakami K., Borlee B. R., Wozniak D. J., Wong G. C. L., Parsek M. R., 2011. The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* 7(1): e1001264, doi: 10.1371/journal.ppat.1001264.

Commission européenne, 2009. Directive 2009/54/EC du parlement européen et du conseil du 18 Juin 2009 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles (Refonte). *Journal officiel de l'union européenne* L 164, 26-6-2009, 13 p.

Conrad J. C., 2012. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Research in microbiology*, 163: 619-629, doi: 10.1016/j.resmic.2012.10.016.

Conrad J. C., Gibiansky M. L., Jin F., Gordon V. D., Motto D. A., Mathewson M. A., Stopka W. G., Zelasko D. C., Shrout J. D., Wong G. C. L., 2011. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 100: 1608-1616.

Conseil National des Etablissement Thermaux (CNETh), 2013. Ouverture de la saison thermale 2013. Communiqué de presse du 3 avrils 2013, Paris, France, 3 p.

- Cooley B. J., Thatcher T. W., Hashmi S. M., L'Her G., Le H. H., Hurwitz D. A., Provenzano, Touhami A., Gordon V. D., 2013. The extracellular polysaccharide Pel makes the attachment of *P. aeruginosa* to surfaces symmetric and short-ranged. *Soft Matter*, 9(14): 3871-3876, doi: 10.1039/C3SM27638D.
- Cornelis P. et Matthijs S., 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads : not only pyoverdines. *Environmental Microbiology*, 4(12): 787-798.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M., 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review in Microbiology*, 49: 711-745.
- Craig L. et Li J., 2008. Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2): 267-277.
- Cunrath O., Gasser V., Hoegy F., Reimann C., Guillon L., Schalk I. J., 2015. A cell biological view of the siderophorepyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 17(1): 171-185, doi:10.1111/1462-2920.12544.
- Das T., Kutty S. K., Kumar N., Manefield M., 2013. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS One*, 8(3): e58299.
- Das T., Kutty S. K., Tavallaie R., Ibugo A. I., Panchompoo J., Sehar S., Aldous L., Yeung A. W. S., Thomas S. R., Kumar N., Gooding J. J., Manefield M., 2015. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Scientific Reports*, 5: 8398, doi: 10.1038/srep08398.
- Das T., Manefield M., 2012. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 7(10): e46718, doi: 10.1371/journal.pone.0046718.
- Das T., Manefield M., 2012. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 7(10): e46718, doi: 10.1371/journal.pone.0046718.
- Das T., Sharma P. K., Busscher H. J., van der Mai H. C., Krom B. P., 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10): 3405-3408, doi: 10.1128/AEM.03119-09.
- Davey M. E., Caiazza N. C., O'Toole G. A., 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185(3): 1027-1036, doi: 10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003.
- De Bentzmann S., Aurouze M., Ball G., Filloux A., 2006. FppA, a novel *Pseudomonas aeruginosa* prepilin peptidase involved in assembly of type IVb pili. *Journal of Bacteriology*, 188(13): 4851-4860, doi: 10.1128/JB.00345-06.

Bibliographie

Denning G. M., Railsback M. A., Rasmussen G. T., Cox C. D., Britigan B. E., 1998. *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. The American Physiological Society, 893-900.

Diduch M., Polkowska Z., Namiesnik J., 2011. Chemical quality of bottled waters: a review. Journal of Food Science, 76(9): 178-196, doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02386.x.

Dietrich L. E. P., Price-Whelan A., Petersen A., Whiteley M., Newman D. K., 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Microbiology, 61(5), 1308-1321, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x.

Direction Générale de la Santé, sous-direction de la gestion des risques des milieux, Bureau des Eaux, 2005. La qualité microbiologique des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques en milieu thermal au cours de la saison thermale 2001. Rapport, France, 22 p.

Direction Générale de la Santé, sous-direction de la veille sanitaire, Bureau de l'eau, 2000. Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux. Bulletin officiel n° 2000-27, France, 21 p.

Directive Européenne, 1998. Directive 98/83/CE du parlement européen et du conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Journal officiel de l'union européenne, L 330 du 05 décembre 1998, 22 p.

Directive Européenne, 2009. Directive 2009/54/CE du parlement européen et du conseil du 18 juin 2009 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles (refonte). Journal officiel de l'union européenne, L164 du 26 juin 2009, 14 p.

Drews G., 2000. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review, 24: 255-249.

Dumas Z., Ross-Gillespie A., Kümmerli R., 2013. Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. Proceedings of the Royal Society B, 280, doi: 10.1098/rspb.2013.1055.

Dunne W.M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately ? Clinical Microbiology Reviews, 15(2): 155-166, doi: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002.

Durojaiye O. C., Carbarns N., Murray S., Majuldar S., 2011. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. Journal of Hospital Infection, 78: 152-159.

Dwidjosiswojo Z., Richard J., Moritz M. M., Dopp E., Flemming H.-C., Wingender J., 2011. Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 214: 485-492, doi:10.1016/j.ijheh.2011.06.004.

- Egli T., 2010. How to live at very low substrate concentration. *Water Research*, 44: 4826-4837, doi: 10.1016/j.watres.2010.07.023..
- Elguindi J., Wagner J., Rensing C., 2009. Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surface. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1448-1455, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04148.x.
- Ernst R. K., Yi E. C., Lim K. B., Burns J. L., Hackett M., Miller S. I., 1999. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 286(5444): 1561-1565.
- Falcone-Dias M. F., Vaz-Moreira I., Manaia C. M., 2012. Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Research*, 46: 3612-3622, doi: 10.1016/j.watres.2012.04.007.
- Fernandez L., Breidenstein E. B. M., Hancock R. E. W., 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14: 1-21, doi: 10.1016/j.drug.2011.01.001.
- Finkel S. E. et Kolter R., 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183(21): 6288-6293, doi: 10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001.
- Flemming H. C., 2001. The perfect slime. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 86: 251-259, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.025.
- Floret N., Bertrand X., Thouverez M., Talon D., 2009. Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie*, 57: 9-12, doi: 10.1016/j.patbio.2008.07.011.
- Franklin M. J., Nivens D. E., Weadge J. T., Howell P. L., 2011. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel and Psl. *FRONTIERS in Microbiology*, 2, article 167, doi: 10.3389/fmicb.2011.00167.
- Friedman L. and Kolter R., 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(14): 4457-4465, doi: 10.1128/JB.186.14.4457-4465.2004.
- Fux C. A., Costerton J. W., Stewart P. S., Stoodley P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *TRENDS in Microbiology*, 13(1): 34-40, doi: 10.1016/j.tim.2004.11.010.
- Galle M., Carpentier I., Beyaert R., 2012. Structure and function of the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protein and Peptide Science*, 13: 831-842.
- Garg A., Jain A., Bhosle N. B., 2009. Chemical characterization of a marine conditioning film. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63: 7-11, doi:10.1016/j.ibiod.2008.05.004.
- Garnett J. A. et Matthews S., 2012. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. *Current Protein and Peptide Science*, 13: 739-755.

- Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z., 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 2008, 18: 1049-1056, doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001.
- Gasser V., Guillon L., Cunrath O., Schalk I. J., 2015. Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* : evidence for siderosomes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Article In Press.
- Gerlach R. G. et Hensel M., 2007. Protein secretion systems and adhesins : the molecular armory of gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 297: 401-415, doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.017.
- Ghafoor A., Hay I. D., Rehm B. H. A., 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and environmental microbiology*, 77(5): 5238-5246, doi:10.1128/AEM.00637-11.
- Giltner C. L., van Schaik E. J., Audette G. F., Kao D., Hodges R. S., Hasset D. J., Irvin R. T., 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesion for both biotic and abiotic surfaces. *Molecular Microbiology*, 59(4): 1083-1096, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05002.x.
- Giraud C. et de Bentzmann S., 2012. Inside the complex regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chaperone usher systems. *Environmental Microbiology*, 14(8): 1805-1816, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02673.x.
- Giraud C., Bernard C. S., Calderon V., Yang L., Filloux A., Molin S., Fichant G., Bordi C., de Bentzmann S., 2011. The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae. *Environmental microbiology*, 13(3): 666-683, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02372.x.
- Giraud C., Bernard C., Ruer S., De Bentzmann S., 2010. Biological 'glue' and 'velcro': molecular tools for adhesion and biofilm formation in the hairy and gluey bug *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports*, 2: 343-358
- Glick R., Gilmour C., Tremblay J., Satanower S., Avidan O., Déziel E., Greenberg E. P., Poole K., Banin E., 2010. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 192(12): 2973-2980, doi: 10.1128/JB.01601-09.
- Gloag E. S. *et al.*, 2013. Self organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *PNAS*, 110(28): 11541-11546, doi: 10.1073/pnas.1218898110/-/DCSupplemental.
- Goulter R. M., Gentle I. R., Dykes G. A., 2009. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 1-7, doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02591.x.
- Grass G., Rensing C., Solioz M., 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5): 1541-1547, doi: 10.1128/AEM.02766-10.

Griffiths M. J., Garcin C., van Hille R. P., Harrison S. T. L., 2011. Interference of pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85: 119-123, doi: 10.1016/j.mimet.2011.02.005.

Grissa I., Bouchon P., Pourcel C., Vergnaud G., 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*, 90(4): 660-8.

Guina T., 2003. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. *American Society for Mass Spectrometry*, 14: 742-751, doi: 10.1016/S1044-0305(03)00133-8.

Guragain M., Lenaburg D. L., Moore F. S., Reutlinger I., Patrauchan M. A., 2013. Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility. *Cell Calcium*, 54: 350-361, doi: 10.1016/j.ceca.2013.08.004.

Guttenplan S. B. et Kearns D. B., 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *Federation of European Microbiological Societies*, 37(6): 849-871, doi: 10.1111/1574-6976.12018.

Güvener Z. T. et Harwood C. S., 2007. Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular Microbiology*, 66(6): 1459-1473, doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06008.x.

Habimana O., Semiao A. J. C., Casey E., 2014. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*, 454: 82-96, doi: 10.1016/j.memsci.2013.11.043.

Haiko J. et Westerlund-Wikström B., 2013. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2: 1242-1267, doi: 10.3390/biology2041242.

Halabi M., Wiesholzer-Pitt M., Schöbert J., Mittermayer H., 2001. Non-touch fittings in hospitals: a possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella spp.*. *Journal of Hospital Infection*, 49: 117-121, doi:10.1053/jhin.2001.1060.

Hall-Stoodley L. et Stoodley P., 2005. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1): 228-223, doi: 10.1016/j.tim.2004.11.004.

Hammes F., Goldschmidt F., Vital M., Wang Y., Egli T., 2010. Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Research*, 44: 3915-3923, doi: 10.1016/j.watres.2010.04.015.

Harimawan A., Rajasekar A., Ting Y.-P., 2011. Bacteria attachment to surfaces – AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. *Journal of Colloid and Interface Science*, 36: 213-218, doi: 10.1016/j.jcis.2011.08.021.

- Harmsen M., Yang L., Pamp S. J., Tolker-Nielsen T., 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance and dispersal. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, 59: 253-268, doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x.
- Hauser A., 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nature Reviews Microbiology, 7(9): 654-655, doi: 10.1038/nrmicro2199.
- Hermansson M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 14: 105-119.
- Hilbert L. R., Bagge-Ravn D., Kold J., Gram L., 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. International Biodeterioration & Biodegradation, 52: 175-185, doi: 10.1016/S0964-8305(03)00104-5.
- Holloway B. W., 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of General Microbiology, 13: 572-581.
- Hori K. et Matsumoto S., 2010. Bacterial adhesion: from mechanism to control. Biochemical Engineering Journal, 48: 424-434, doi: 10.1016/j.bej.2009.11.014.
- Hugh R. et Leifson E., 1965. The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, 14(2): 69-84.
- Hunt S. M., Werner E. M., Huang B., Hamilton M. A., Stewart P. S., 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. Applied and Environmental Microbiology, 70(12): 7418-7425, doi: 10.1128/AEM.70.12.7418-7425.2004.
- Huynh T. T., McDougald D., Klebensberger J., Al Quarni B., Barraud N., Rice S. A., Kjelleberger S., Schleheck D., 2012. Glucose starvation-induced dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is cAMP and energy dependent. PLoS ONE, 7(8): e42874, doi:10.1371/journal.pone.0042874.
- Ibarluzea J., Moreno B., Zigorraga C., Castilla T., Martinez M., Santamaria J., 1998. Determinants of the microbiological water quality of indoor swimming-pools in relation to disinfection. Water Research, 32(3): 865-871.
- Imperi F., Visca P., 2013. Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of *Pseudomonas aeruginosa*: a membrane-associated “siderosome”. FEBS Letters, 587: 3387-3391, doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.039.
- Jackson K. D., Starkey M., Kremer S., Parsek M. R., Wozniak D. J., 2004. Identification of psl, a locus encoding a potential EPS that is essential for PAO1 biofilm formation. Journal of bacteriology, 186(14) : 4466-4475, doi: 10.1128/JB.186.14.4466-4475.2004.

- Jazé-Charvolin M.-R., 2014. Les stations thermales : de l'abandon à la renaissance. Une brève histoire du thermalisme en France depuis l'Antiquité. In situ Revue des patrimoines, 24: 1-11, doi: 10.4000/insitu.11123.
- Kannan A. et Gautam P., 2015. A quantitative study on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. SpringerPlus, 4: 379, doi: 10.1186/s40064-015-1029-0.
- Kaplan J. B., 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. Journal of Dental Research, 89(3): 205-218, doi: 10.1177/0022034509359403.
- Kaszab E., Szoboszlay S., Dobolyi C., Hahn J., Pék N., Kriszt B., 2011. Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. Bioresource Technology, 102: 1543-1548, doi:10.1016/j.biortech.2010.08.027.
- Kato J., Kim H.-E., Takiguchi N., Kuroda A., Ohtake H., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. Journal of Bioscience and Bioengineering, 106(1): 1-7, doi: 10.1263/jbb.106.1.
- Katsikogianni M. et Missirlis Y. F., 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. European Cells and Materials, 8: 37-57.
- Kearns D. B., 2010. A field of guide to bacterial swarming motility. Nature Review in Microbiology, 8(9): 634-644, doi: 10.1038/nrmicro2405.
- Khalaphallah R. et Andres Y., 2012. The effect of various abiotic factors on the survival growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in bathroom greywater. Journal of Water Reuse and Desalination, 2(2): 92-101, doi: 10.2166/wrd.2012.076.
- Khan N. H., Ishii Y., Kimata-Kino N., Esaki H., Nishino T., Nishimura M., Kogure K., 2007. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical and animal isolates. Microbiological Ecology, 53(2): 173-186, doi: 10.1007/s00248-006-9059-3.
- Kholer T., Curty L. K., Barja F., van Delden C., Pechere J.-C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. Journal of bacteriology, 182(21): 5990-5996.
- Kilb B., Lange G., Flemming H.-C., Wingender J., 2003. Contaminations of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 206: 563-573.
- Kimata N., Nishino T., Suzuki S., Kogure K., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microbial Ecology, 47(1): 41-47, doi: 10.1007/s00248-003-1032-9.

- King J. D., Kocincova D., Westman E. L., Lam J. S., 2009. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 15(5): 261-312, doi: 10.1177/1753425909106436.
- Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies infectieuses*, 36: 78-91, doi:10.1016/j.medmal.2005.10.007.
- Kirisits M. J., Margolis J. J., Purevdorj-Gage B. L., Vaughan B., Chopp D. L., Stoodley P., Parsek M. R., 2007. Influence of the hydrodynamic environment on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 189(22): 8357-8360, doi: 10.1128/JB.01040-07.
- Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambersten L., Aas-Jorgensen A., Molin S., Tolken-Nielsen T., 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6): 1511-1524, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x.
- Klebensberger J., Birkenmaier A., Geffers R., Kjelleberg S., Philipp B., 2009. SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 11(12): 3037-3086, doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02012.x.
- Koh A. Y., Priebe G. P., Pier G. B., 2005. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infection and Immunity*, 73: 2262-2272, doi: 10.1128/IAI.73.4.2262-2272.2005.
- Kohler T., Kocjancic Curty L., Barja F., Van Delden C., Pechère J.-C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 5990-5996
- Krasteva P. V., Giglio K. M., Sondermann H., 2012. Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Science*, 21: 929-948, doi: 10.1002/pro.2093.
- Krell T., Lacal J., Munoz-Martinez F., Reyes-Darias J. A., Cadirci B. H., Garcia-Fontana C., Ramos J. L., 2011. Diversity at its best : bacterial taxis. *Environmental Microbiology*, 13(5): 1115-1124, doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02383.x.
- Kumar A. et Ting Y.-P., 2013. Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation. *Colloids and Surfaces N: Biointerfaces*, 111: 747-754, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.011.
- Lam J. S., Taylor V. L., Islam S. T., Hao Y., Kocincova D., 2011. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *FRONTIERS in Microbiology*, 2: (article 118), doi: 10.3389/fmicb.2011.00118.

- Landry A. P., Cheng Z., Ding H., 2013. Iron binding activity is essential for the function of IscA in iron-sulphur cluster biogenesis. *Dalton Transactions*, 42(9): 3100-3106, doi: 10.1039/c2dt32000b.
- Larché J., Pouillot F., Essoh C., Libisch B., Straut M., Lee J. C., Soler C., Lamarca R., Gleize E., Gabard J., Vergnaud G., Pourcel C., 2012. Rapid identification of international multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones by multiple-locus variable number of tandem repeats analysis and investigation of their susceptibility to lytic bacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12): 6175-6180, doi:10.1128/AAC.01233-12.
- Lashéras A., Guisset O., Boulestreau H., Rogues A.-M., Fiore M., Szajner S., Beziau M.-C., Gabinski C., Gachie J.-P., 2006. Réservoirs et transmission de *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation médicale. *Médecine et maladies infectieuses*, 36 : 99-104, doi:10.1016/j.medmal.2005.11.014.
- Lau P. C. Y., Lindhout T., Beveridge T. J., Dutcher J. R., Lam J. S., 2009. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191(21): 6681-6631, doi:10.1128/JB.00698-09.
- Lavenir R., Jocktane D., Laurent F., Nazaret S., Cournoyer B., 2007. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *Journal of Microbiology Methods*, 70: 20-29, doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.008.
- LeChevallier M. W., Schulz W., Lee R. G., 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3): 857-862.
- Lecuyer S., Rusconi R., Shen Y., Forsyth A., Vlamakis H., Kolter R., Stone H. A., 2011. Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 100: 341-350, doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.078.
- Lee J. et Zhang L., 2014. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, doi: 10.1007/s13238-014-0100-x.
- Legnagi P., Leoni E., Rapuano S., Turin D., Valenti C., 1999. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *International Journal of Food Microbiology*, 53: 153-158.
- Lehtola M. J., Miettinen I. T., Keinanen M. M., Kekki T. K., Laine O., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P. J., 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research*, 38: 3769-3779.
- Lehtola M. J., Miettinen I. T., Lampola T., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P. J., 2005. Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems. *Water Research*, 39: 1962-1971, doi: 10.1016/j.watres.2005.03.009.

Bibliographie

- Lequette Y., Greenberg E. P., 2005. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187(1): 37-44, doi: 10.1128/JB.187.1.37-44.2005.
- Lindhout T., Lau P. C. Y., Brewer D., Lam J. S., 2009. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology*, 155: 3449-3460, doi: 10.1099/mic.0.030510-0.
- Livny J., Brencic A., Lory S., Waldor M. K., 2006. Identification of 17 *Pseudomonas aeruginosa* sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatics tool sRNAPredict2. *Nucleic Acids Research*, 34(12): 3484-3493, doi: 10.1093/nar/gkl453.
- Llamas M. A., Imperi F., Visca P., Lamont I. L., 2014. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review*, 38: 569-597, doi: 10.1111/1574-6976.12078.
- Loveday H. P., Wilson J. A., Kerr K., Pitchers R., Walker J. T., Browne J., 2014. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 86: 7-15, doi: 10.1016/j.jhin.2013.09.010.
- Lucchetti-Miganeh C., Redelberger D., Chambonnier G., Rechenmann F., Elsen S., Bordi C., Jeannot K., Attrée I, Plésiat P., De Bentzmann S., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution in patients and under the hospital environment. *Pathogens*, 3: 309-340, doi: 10.3390/pathogens3020309.
- Lund J. W., 1996. Balneological use of thermal and mineral waters in the USA. *Geothermics*, 25(1): 103-147.
- Lyczak J. B., Cannon C. L., Pier G. B., 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2: 1051-1060.
- 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 Pathogens*, 2009, 5(3): e1000354, doi:10.1371/journal.ppat.1000354.
- Ma L., Jackson K. D., Landry R. M., Parsek M. R., Wozniak D. J., 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188(21): 8213-8221, doi:10.1128/JB.01202-06.
- Ma L., Lu H., Sprinkle A., Parsek M. R., Wozniak D. J., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactos and mannose-rich exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 189(22): 8353-8356, doi: 10.1128/JB.00620-07.

Bibliographie

- Malone J. G., Jaeger T., Spangler C., Ritz D., Spang A., Arrieumerlou C., Kaever V., Landmann R., Urs J., 2010. YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathogens, 6(3): e1000804. doi:10.1371/journal.ppat.1000804.
- Mann E. E., Wozniak D. J., 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. Federation of European Microbiological Societies Microbiological Review, 36: 893-916, doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.
- Martinez L. C., Vadyvaloo V., 2014. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. Cellular and Infection Microbiology, 4(38), doi: 10.3389/fcimb.2014.00038.
- Martins M. T., Sato M. I. Z., Alves M. N., Stoppe N. C., Prado V. M., Sanchez P. S., 1995. Assessment of microbiological quality for swimming pools in South America. Water Research, 29(10): 2417-2420.
- Mathieu L., Bertrand I., Abe Y., Angel E., Block J. C., Skali-Lami S., Francius G., 2014. Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. Water Research, 55: 175-184, doi: 10.1016/j.watres.2014.01.054.
- Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Delaney S. M., Soule M. J., Phillips G., Thomashow L. S., 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and Phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of bacteriology, 183(21): 6454-6465, doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001.
- McDonnell G. et Russell A. D., 1999. Antiseptic and disinfectants: activity, action and resistance. Clinical Microbiology Reviews, 12(1): 147-179.
- Mehtar S., Wiid I., Todorov S. D., 2008. The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. Journal of Hospital infection, 68: 45-51, doi: 10.1016/j.jhin.2007.10.009.
- Mena K. D. et Gerda C. P., 2009. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 201: 71-114, doi: 10.1007/978-1-4419-0032-6_3.
- Mentel M., Ahuja E. G., Mavrodi D. V., Breinbauer R., Thomashow L. S., Blankenfheldt W., 2009. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. ChemBioChem, 10: 2295-2304, doi: 10.1002/cbic.200900323.
- Merritt J. H., Brothers K. M., Kuchma S. L., O'Toole G. A., 2007. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. Journal of Bacteriology, 189(22): 8154-8164.

Bibliographie

Merritt J.H., Ha D.-G., Cowles K. N., Lu W., Morales D. K., Rabinowitz J., Gitai Z., O'Toole G. A., 2010. Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylatecyclases. *mBio* 1(4):e00183-10, doi: 10.1128/mBio.00183-10.

Meyer J. M., et Abdallah M. A., 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107: 319-328.

Meyer J.-M., Stintzi A., de Vos D., Cornelis P., Tappe R., Taraz K., Budzikiewicz H., 1997. Use of siderophores to type pseudomonads : the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology*, 143: 35-43.

Miettinen I. T., Vartiainen T., Martikainen P. J., 1997. Phosphorus and bacterial growth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8): 3242-3245.

Mikkelsen H., Sivaneson M., Filloux A., 2011. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 13(7): 1666-1681, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x.

Mills E., Pultz I. S., Kulasekara H. D., Miller S. I., 2011. The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signaling. *Cellular Microbiology*, 13(8): 1122-1129, doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01619.x.

Ministère de la santé et des solidarités, 2007. Arrêté du 5 mars 2007 relatif à la constitution du dossier de demande d'autorisation d'exploiter une source d'eau minérale naturelle pour le conditionnement, l'utilisation à des fins thérapeutiques dans un établissement thermal ou la distribution en buvette publique. *Journal officiel de la République Française*, n° 73 du 27 mars 2007, page 5670, texte 30 sur 158, 6 p.

Ministère de la santé et des solidarités, 2007. Arrêté du 14 mars 2007 relatif aux critères de qualité des eaux conditionnées, aux traitements et mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique. *Journal officiel de la République Française*, n° 81 du 5 avril 2007, page 6431, texte n° 46, 9 p.

Ministère de la santé et des solidarités, 2007. Arrêté du 27 février 2007 relatif aux traitements de l'eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques dans les établissements thermaux. *Journal officiel de la République Française*, texte 28 sur 158, 2 p.

Ministère de la santé et des solidarités, 2007. Décret n° 2007-49 du 11 janvier 2007 relatif à la sécurité sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine. *Journal officiel de la République Française*, texte 20 sur 143, 23 p.

Mitchell J. G. et Kogure K., 2006. Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *Federation of European Microbiological Societies*, 55: 3-16, doi: 10.1111/j.1574-6941.2005.00003.x.

- Momtaz H., Rahimi E., Moshkelani S., 2011. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by PCR in tap-water and bottled mineral water in the Isfahan province of Iran. *Water Science & Technology: Water Supply*, 11(5): 642-646, doi: 10.2166/ws.2011.108.
- Morales D. K., Grahl N., Okegbe c., Dietrich N. J., Jacobs N. J., Hogan D. A., 2013. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *mBio*, 4(1): e00526-12.
- Morin J.-P., Graber-Duvernay B., 2002. Surveillance des *Pseudomonas* et expérience de désinfection aux thermes nationaux d'Aix-Les-Bains. *Presse thermale et climatique*, 139: 41-51.
- Moritz M., Flemming H.-C., Wingender J., 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213: 190-197, doi: 10.1016/j.ijheh.2010.05.003.
- Mulcahy H. et Lewenza S., 2011. Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PLoS ONE*, 6(8): e23307, doi: 10.1371/journal.pone.0023307.
- Mulcahy H., Charron-Mazenod L., Lewenza S., 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(11): e1000213, doi:10.1371/journal.ppat.1000213.
- Mulcahy H., Charron-Mazenod L., Lewenza S., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environmental Microbiology*, 12(6): 1621-1629, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02208.x.
- Mulet X., Cabot G., Ocampo-Sosa A. A., Dominguez M. A., Zamorano L., Juan C., Tubau F., Rodriguez C., Moyà B., Pena C., Martinez-Martinez L., Oliver A., 2013. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *American Society for Microbiology*, 57(11): 5527-5535, doi: 10.1128/AAC.01481-13.
- Nagant C., Tré-Hardy M., Devleeschouwer M., Dehaye J. P., 2010. Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *Journal of Microbiological Methods*, 82: 243-248, doi:10.1016/j.mimet.2010.06.011.
- O'May C. Y., Sanderson K., Roddam L. F., Kirov S. M., Reid D. W., 2009. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *Journal of Microbiology*, 58: 765-773.
- O'Toole G. A. and Kolter R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2): 295-304.

Bibliographie

Oh Y. J., Lee N. R., Jo W., Jung W. K., Lim J. S., 2009. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 109: 874-880, doi: 10.1016/j.ultramic.2009.03.042.

Oliver J. D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Review*, 34: 415-425, doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.

Palleroni N. J., 2010. The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*, 12(6): 1377-1383, doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.

Pamp S. J. et Tolker-Nielsen T., 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6): 2531-2539, doi: 10.1128/JB.01515-06.

Papapetropoulou M., Llipoulou J., Rodopoulou G., Detorakis J., Paniara O., 1994. Occurrence and antibiotic-resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in southern Greece. *Journal of Chemotherapy*, 6(2): 111-116.

Park S.-K. et Hu J. Y., 2010. Interaction between phosphorus and biodegradable organic carbon on drinking water biofilm subject to chlorination. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 2077-2087, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04612.x.

Parsek M. et Tolker-Nielsen T., 2008. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 560-566, doi: 10.1016/j.mib.2008.09.015.

Patrauchan M. A., Sarkisova S. A., Franklin M. J., 2007. Strain specific proteome responses of *Pseudomonas aeruginosa* to biofilm-associated growth and calcium. *Microbiology*, 153: 3838-3851, doi: 10.1099/mic.0.2007/010371-0.

Patriquin G. M., Banin E., Gilmour C., Tuchman R., Greenberg E. P., Poole K., 2008. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 662-671, doi: 10.1128/JB.01473-07.

Pelcic V., 2008. Type IV pili: *e pluribus unum* ? *Molecular Microbiology*, 68(4): 827-837, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06197.x.

Pereira F. D. E. S., Bonatto C. C., Lopes C. A. P., Pereira A. L., Silva L. P., 2015. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces. *Microbial Pathogenesis*, 86: 32-37, doi: 10.1016/j.micpath.2015.07.005.

Peterson B. W., van der Mai H. C., Sjollem J., Busscher H. J., Sharma P. K., 2013. A distinguishable role of eDNA in the viscoelastic relaxation of biofilms. *mBio*, 4(5): e00497-13, doi: 10.1128/mBio.00497-13.

Petraccia L., Liberati G., Masciullo S. G., Grassi M., Fraioli A., 2006. Water, mineral waters and health. *Clinical nutrition*, 25: 377-385, doi: 10.1016/j.clnu.2005.10.002.

- Petrova O. A. et Sauer K., 2012. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*, 194(10): 2413-2425, doi: 10.1128/JB.00003-12.
- Petrova O. E. et Sauer K., 2009. A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathogens*, 5(11): e1000668, doi:10.1371/journal.ppat.1000668.
- Pierson III L. S. et Pierson E. A., 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnical processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86: 1659-1670, doi: 10.1007/s00253-010-2509-3.
- Pitondo-Silva A., Martins V. V., Fernandes A. F. T., Stehling E. G., 2014. High level of resistance to Aztreonam and Ticarcillin in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil of different crops in Brazil. *Science of Total Environment*, 473-474: 155-158, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.021.
- Planchon M., Jittawuttipoka T., Cassier-Chauvat C., Guyot F., Chauvat F., Spalla O., 2013. Influence of exopolysaccharides on the electrophoretic properties of the model cyanobacterium *Synechocystis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110: 171-177, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.03.057.
- Polanska M., Huysman K., Van Keer C., 2005. Investigation of microbially available phosphorus (MAP) in Flemish drinking water. *Water Research*, 39: 2267-2272, doi: 10.1016/j.watres.2005.04.019.
- Poortinga A. T., Bos R., Norde W., Busscher H. J., 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports*, 47: 1-32.
- Popoff G., 2010. Spécificité, législation et contrôle des eaux minérales naturelles utilisés dans les établissements thermaux français. *Presse thermale et climatique*, 147(2): 93-106.
- Purevdorj B., Costerton J. W., Stoodley P., 2002. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9): 4457-4464, doi: 10.1128/AEM.68.9.4457-4464.2002.
- Quick J., Cumley N., Wearn C. M., Niebel M., Constantinidou C., Thomas C. M., Pallen M. J., Moïemen N. S., Bamford A., Oppenheim B., Loman N. J., 2014. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open*, 4:e006278, doi: 10.1136/bmjopen-2014-006278.
- Ramachandran G., 2014. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in spesis. *Virulence*, 5(1): 213-218, doi: 10.4161/viru.27024.
- Rau M. H., Hansen S. K., Johansen H. K., Thomsen L. E., Workman C. T., Nielsen K. F., Jelsbak L., Hoiby N., Yang L., Molin S., 2010. Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the

airways of human cystic fibrosis hosts. *Environmental Microbiology*, 12(6): 1643-1658, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02211.x.

Repoila F. et Darfeuille F., 2009. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biology of the Cell*, 101: 117-131, doi: 10.1042/BC20070137.

Reuter S., Sigge A., Wiedeck H., Trautmann M., 2002. Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Critical Care Medicine*, 30(10): 2222-2228.

Rice S. A., van den Akker B., Pomati F., Roser D., 2012. A risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools: a review. *Journal of Water and Health*, 10(2): 181-196, doi: 10.2166/wh.2012.020.

Richards G. R. et Vanderpool C. K., 2011. Molecular call and response: the physiology of bacterial small RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809: 525-531, doi:10.1016/j.bbagr.2011.07.013.

Rickard A. H. , Gilbert P., High N. J., Kolenbrander P. E. et Handley P. S., 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *TRENDS in Microbiology*, 11(2): 94-100.

Rickard A. H., McBain A. J., Stead A. T., Gilbert P., 2004. Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 7426-7435, doi: 10.1128/AEM.70.12.7426-7435.2004.

Rogers J., Dowsett A. B., Dennis P. J., Lee J. V., Keevil C. W., 1994A. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6): 1842-1851.

Rogers J., Dowsett A. B., Dennis P. J., Lee J. V., Keevil C. W., 1994B. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5): 1585-1592.

Rogues A.-M., Boulestreau H., Lashéras A., Boyer A., Gruson D., Merle C., Castaing Y., Bébear C. M., Gachie J.-P., 2007. Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 67: 72-78, doi:10.1016/j.jhin.2007.06.019.

Roser D. J., van den Akker B., Boase S., Haas C. N., Ashbolt N. J., Rice S. A., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* dose response and bathing water infection. *Epidemiology and Infection*, doi: 10.1017/S0950268813002690.

Russell A. D., 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *THE LANCET Infectious Diseases*, 3: 794-803.

- Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J., 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 644-648, doi: 10.1016/j.mib.2007.09.010.
- Sanchez C. J., Mende K., Beckius M. L., Akers K. S., Romano D. R., Wenke J. C., Murray C. K., 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Disease*, doi: 10.1186/1471-2334-13-47.
- Sardis M. F. et Economou A., 2010. SecA: a tale of two promoters. *Molecular Microbiology*, 76(5): 1070-1081, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07176.x.
- Sarkisova S., Patrauchan M. A., Berglund D., Nivens D. E., Franklin M. J., 2005. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, 187(13): 4327-4337, doi:10.1128/JB.187.13.4327-4337.2005.
- 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. *Journal of Bacteriology*, 186(21): 7312-7326, doi: 10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004.
- Schalk I. J. et Guillon L., 2012. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa* : implication for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/1462-2920.12013.
- Schalk I. J., Hannauer M., Braud A., 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, 13(11): 844-2854, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x.
- Schmidt-Lorenz W., 1976. Microbiological characteristics of natural mineral water. *Annali dell Istituto Superiore di Sanita*, 12(2-3): 93-112.
- Schneider R. P., 1996. Conditioning film-induced modification of substratum physicochemistry – Analysis by contact angles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 182: 204-213.
- Schurr M. J., 2013. Which Bacterial Biofilm Exopolysaccharide is Preferred, Psl or Alginate? *Journal of Bacteriology*, 195(8): 1623-1626, doi: 10.1128/JB.00173-13.
- Schwartz T., Volkmann H., Kirchen S., Kohnen W., Schön-Hölz, Jansen B., Obst U., 2006. Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Ecology*, 57: 158-167, doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00100.x.
- Sécurité sociale, commission des comptes, 2008. Les comptes de la sécurité sociale, résultats 2007, prévisions 2008. Rapport, France, 256 p.

- Serbulea M. et Payyappallimana U., 2012. *Onsen* (hot springs) in Japan – Transforming terrain into healing landscapes. *Health & Place*, 18: 1366-1373, doi: 10.1016/j.healthplace.2012.06.020.
- Shirtliff M. E., Mader J. T., Camper A. K., 2002. Molecular interactions in biofilms. *Chemistry & Biology*, 9: 859-871.
- Shrout J. D., Chopp D. L., Just C. L., Hentzer M., Giskov M., Parsek M. R., 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular microbiology*, 62(5): 1264-1277, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x.
- Simoes L. C., Simoes M., Oliveira R., Vieira M. J., 2007. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 174-183, doi: 10.1002/jobm.200610224.
- Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., Welsh M. J., 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417.
- Smith R. M. and Martell A. E., 1989. Critical constant stability – volume 4: Inorganic complexes. Plenum Press, New-York and London.
- Sommer P., Martin-Rouas C., Mettler E., 1999. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiology*, 16: 503-515.
- Sonnleitner E., Romeo A., Bläsi U., 2012A. Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA biology*, 9(4): 364-371, doi: 10.4161/rna.19231.
- Sonnleitner E., Valentini M., Wenner N., el Zahar Haichar F., Hass D., Lapouge K., 2012B. Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 7(10): e44637, doi: 10.1371/journal.pone.0044637.
- Soto G. E. et Hultgren S. J., 1999. Bacterial adhesins : common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*, 181(4): 1059-1071.
- Southey-Pillig C. J., Davies D. G., Sauer K., 2005. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, 187(23): 8114-8126, doi:10.1128/JB.187.23.8114–8126.2005.
- Stanley N. R. et Lazazzera B. A., 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular microbiology*, 52(4): 917-924, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x.
- Stapper A. P., Narasimhan G., Ohman D. E., Barakat J., Hentzer M., Molin S., Kharazmi A., Hoiby N., Mathee K., 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

development and architecture but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 679-690, doi: 10.1099/jmm.0.45539-0.

Stojek N. M. et Dutkiewicz J., 2011. Co-existence of *Legionella pneumophila* and other gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18(2): 330-334.

Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L., Boyle J. D., Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and environmental Microbiology*, 67(12): 5608-5613, doi: 10.1128/AEM.67.12.5608-5613.2001.

Storz G., Vogel J., Wassarman K. M., 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular cell*, 43: 880-891, doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.022.

Stover *et al.*, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.

Sutherland I. W., 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS in microbiology*, 9(5): 222-227.

Suzuki Y., Kaji S., Nisjiyama M., Iguchi A., 2013. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Science of the Total Environment*, 450-451: 148-154, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.011.

Szita G., Gyenes M., Soos L., Rétfalvi T., Békési L., Sciko G., Bernath S., 2006. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples using a novel synthetic medium and impedimetric technology. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 42-46, doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02145.x.

Tabone W., 2009. Le thermalisme français dans les comptes de la nation : une approche macro-économique. *Presse thermale et climatique*, 146: 67-73.

Tariq M., Bruijs C., Kok J., Krom B. P., 2012. Link between culture zeta potential homogeneity and Ebp in *Enterococcus faecalis*. *American Society for Microbiology*, doi: 10.1128/AEM.07618-11.

Teitzel G. M., Geddie A., De Long S. K., Kirisits M. J., Whiteley M., Parsek M. R., 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(20): 7242-7256, doi: 10.1128/JB.00837-06.

Thiolet J.-M., Vaux S., Lamy M., Gautier A., Barret A. S., Léon L., Coignard B., 2012. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. *Résultats*, 181 p.

Thorolfssdottir B. O. Th. et Marteinson V. T., 2013. Microbiological analysis in three diverse natural geothermal bathing pools in Iceland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10: 1085-1099, doi: 10.3390/ijerph10031085.

Tielen P., Rosenau F., Wilhem S., Jaeger K-E., Flemming H-C., Wingender J., 2010. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 156: 2239-2252, doi: 10.1099/mic.0.037036-0037036 G.

Timperley D. A., 1989. Cleaning in place (CIP). *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42(2): 32-33.

Tonko C. M., Kiraly A., Miszezy P., Patzay G., Csefalvay E., 2013. Limitation of hardness from thermal water by means of nanofiltration. *Water Science and Technology*, 67(9): 2025-2032, doi: 10.2166/wst.2013.078.

Toté K., Horemans T., Vanden Berghje D., Maes L., Cos P., 2010. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10): 3135-3142, doi:10.1128/AEM.02095-09.

Toutain C. M., Caiazza N. C., Zegans M. E., O'Toole G. A., 2007. Roles for flagellar staters in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 158: 471-477, doi: 10.1016/j.resmic.2007.04.001.

Traczewska T. M. et Sitarska M., 2009. Development of biofilm on synthetic polymers used in water distribution. *Environment Protection Engineering*, 35(1): 151-159.

Trautmann M., Bauer C., Schumann C., Hahn P., Höer M., Haller M., Lepper P. M., 2006. Common RAPD pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from patients and tap water in a medical intensive care unit. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209: 325-331.

Trautmann M., Michalsky T., Wiedeck H., Radosavlejc V., Ruhnke M., 2001. Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit and relationship to *Pseudomonas* infections in ICU patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22: 49-52.

Triandafillu K., Balazs D. J., Aronsson B.-O., Descouts P., Tu Quoc P., van Delden C., Mathieu H. J., Harms H., 2003. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly(vinyl chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices. *Biomaterials*, 24: 1507-1518.

Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Hirata A., 2004. Significance of cell electrokinetic properties determined by soft-particle analysis in bacterial adhesion onto a solid surface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 279: 410-417, doi: 10.1016/j.jcis.2004.06.070.

Vallés J., Mariscal D., Cortés P., Coll P., Villagra A., Diaz E., Artigas A., Rello J., 2004. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective

- study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Medicine*, 30(9): 1768-1775.
- Vallet I., Olson J. W., Lory S., Lazdunski A., Filloux A., 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *PNAS*, 98(12): 6911-6916, doi: 10.1073/pnas.111551898.
- Van Alst N. E., Picardo K. F., Iglewski B. H., Haidaris C. G., 2007. Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 75(8): 3780-3790, doi: 10.1128/IAI.00201-07.
- Van der Kooij D., Veenendaal H. R., Scheffer W. J. H., 2005. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Research*, 39: 2789-2798, doi: 10.1016/j.watres.2005.04.075.
- Van der Mee-Marquet N., Bloc D., Briand L., Besnier J.-M., Quentin R., 2005. Non-touch fittings in hospitals: a procedure to eradicate *Pseudomonas aeruginosa* contamination. *Journal of Hospital Infection*, 60: 235-239, doi: 10.1016/j.jhin.2004.11.023.
- Van der Waal S. V. et Van Der Sluis L. W. M., 2012. Potential of calcium to scaffold and endodontic biofilm, thus protecting the micro-organisms from disinfection. *Medical Hypotheses*, 79: 1-4, doi: 10.1016/j.mehy.2012.03.012.
- Van Merode A. E. J., Van Der Mai H. C., Busscher H. J., Krom B., 2006. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 188(7): 2421-2426, doi: 10.1128/JB.188.7.2421-2426.2006.
- Van Schaik E. J., Giltener C. L., Audette G. F., Keizer D. W., Bautista D. L., Slupsky C. M., Sykes B. D., Irvin R. T., 2005. DNA binding : a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pili. *Journal of bacteriology*, 187(4): 1455-1464, doi: 10.1128/JB.187.4.1455-1464.2005.
- Vasil M. L. et Ochsner U. A., 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron : genetics, biochemistry and virulence. *Molecular Microbiology*, 34(3): 399-413.
- Venieri D, Vantarakis A., Komninou G., Papapetropoulou M., 2006. Microbiological evolution of bottled non-carbonated ("still") water from domestic brands in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 68-72, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.013.
- Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaer J., Vermant J., Michiels J., 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *TRENDS in Microbiology*, 16(10): 496-506, doi: 10.1016/j.tim.2008.07.004.
- Victor F., Moisset P., 2011. La diversification des activités des stations thermales. Rapport du conseil national du tourisme, section des politiques territoriales et du développement durable, ministère de l'économie, des finances et de l'industrie, France, 74 p.

- Visca P., Imperi F., Lamont I. L., 2006. Pyoverdinesiderophores: from biogenesis to biosignificance. *TRENDS in Microbiology*, 15(1): 22-30, doi:10.1016/j.tim.2006.11.004.
- Vital M., Stucki D., Egli T., Hammes F., 2010. Evaluating growth potential of pathogenic bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19): 6477-6484, doi: 10.1128/AEM.00794-10.
- Vu-Thien H., Corbineau G., Hormigos K., Fauroux B., Corvol H., Clément A., Vergnaud G., Pourcel C., 2007. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*, 45(10): 3175-3183, doi: 10.1128/JCM.00702-07.
- Walker J. T., Jhutti A., Parks S., Willis C., Copley V., Turton J. F., Hoffman P. N., Bennett A. M., 2014. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. *Journal of Hospital Infection*, 86: 16-23, doi : 10.1016/j.jhin.2013.10.003.
- Wang S., Parsek M. R., Wozniak D. J., Ma L. Z., 2013. A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 15(8): 2238-2253, doi: 10.1111/1462-2920.12095.
- Wang Y., Wilks J. C., Danhorn T., Ramos I., Croal L., Newman D. K., 2011. Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *Journal of Bacteriology*, 193(14): 3606-3617, doi: 10.1128/JB.00396-11.
- Wei Q., Ma L. Z., 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Science*, 14: 20983-21004, doi: 10.3390/ijms141020983.
- Weinberg E. D., 2004. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Medical Hypothesis*, 63: 863-865, doi: 10.1016/j.mehy.2004.04.010.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10): 6188-6196, doi: 10.1128/AEM.70.10.6188-6196.2004.
- Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C., Mattick J. S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 259(22): 1487.
- Whitehead K. A., Colligon J., Verran J., 2005. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41: 129-138, doi:10.1016/j.colsurfb.2004.11.010.
- Wilson W. W., Wade M. M., Holman S. C. H., Champlin F. R., 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 43: 153-164.

- Wingender J. et Flemming H-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International journal of Hygiene and Environmental Health*, 214: 417-423, doi:10.1016/j.ijheh.2011.05.009.
- Wolf P. et Elsässer-Beile U., 2009. *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology*, 299: 161-176, doi: 10.1016/j.ijmm.2008.08.003.
- Wozniak D. J., Wyckoff T. J. O., Starkey M., Keyser R., Azadi P., O'Toole G. A., Parsek M. R., 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PNAS*, 100(13): 7907-7912, doi: 10.1073/pnas.1231792100.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10): 4035-4039.
- Xu Z., Islam S., Wood T. K., Huang Z., 2015. An integrated modeling and experimental approach to study the influence of environmental nutrients on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMed Research International*, 2015, doi.org/10.1155/2015/506782.
- Yang L., Barken K. B., Skindersoe M. E., Christensen A. B., Givskov and Tolker-Nielsen T., 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153: 1318-1328, doi: 10.1099/mic.0.2006/004911-0.
- Yu J., Kim D., Lee T., 2010. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Science and Technology*, 61(1): 163-171, doi: 10.2166/wst.2010.813.
- Zamberlan da Silva M. E., Getirana Santana R., Guilhermetti M., Camargo Filho I., Herue Endo E., Ueda-Nakamura T., Vataru Nakamura C., Prado Dias Filho B., 2008. Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211: 504-509, doi: 10.1016/j.ijheh.2007.09.004.
- Zhang W., Sun J., Ding W., Lin J., Tian R., Lu L., Liu X., Shen X., Qian P.-Y., 2015. Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *FRONTIERS in Cellular and Infection Microbiology*, 5(article 40), doi: 10.3389/fcimb.2015.00040.
- Zhao K., Tseng B. S., Beckerman B., Jin F., Gibiansky M. L., Harrison J. J., Luijten E., Parsek M. R., Wong G. C. L., 2013. Psl trails guide exploration and microcolony formation in early *P. aeruginosa* biofilms. *Nature*, 497(7449): 388-391, doi:10.1038/nature12155.

Thèse de Doctorat

Coline PESSEREAU

Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale.

Study of biotic and abiotic factors that control the implementation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in thermal water distribution networks.

Résumé

Les eaux minérales naturelles se distinguent de l'eau potable par leur contenu en sels minéraux et en éléments traces. Leur utilisation à des fins thérapeutiques s'effectue sous contrôle médical dans des établissements thermaux. La gestion des réseaux de distribution ainsi que la qualité microbiologique de l'eau font l'objet de réglementations. Malgré la mise en place de procédures spécifiques, les établissements thermaux sont régulièrement confrontés à des contaminations microbiologiques majoritairement dues à *P. aeruginosa*. Ce pathogène opportuniste possède d'importantes capacités d'adaptation, de résistance et de persistance dans l'environnement, notamment sous forme de biofilms.

L'objectif de ces travaux de thèse est d'apporter des éléments de compréhension sur le comportement de *P. aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau minérale naturelle et de valider l'efficacité de produits de traitement.

L'influence de la composition minérale de 3 eaux sur les capacités à former du biofilm de 9 souches de *P. aeruginosa* d'origines diverses a pu être démontrée. Il apparaît que les quantités de biofilms produites au bout de 24 h sont moins importantes pour la minéralisation forte. La modulation de la production de facteurs de virulence en fonction de la qualité de l'eau est corrélée à l'action spécifique de certains ions et à la biodisponibilité du fer. En conditions de minéralisation forte il a été montré que les matériaux organiques favorisent la formation de biofilm de *P. aeruginosa* tandis que les matériaux métalliques ont tendance à la défavoriser. L'efficacité d'une séquence de traitement de postes de soins a pu être validée sur un modèle de biofilm âgé de 24 h et sur tous les matériaux.

Mots clés

Eaux thermales, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, minéralisation, matériaux, désinfection

Abstract

Natural mineral waters are distinguished from drinking water by their content in minerals and trace elements. Their use for therapeutic purposes under medical control is performed in spas. Management of distribution networks and the microbiological quality of water are subject to regulations. Despite the establishment of specific procedures, spas are regularly confronted with microbiological contamination mainly due to *P. aeruginosa*. This opportunistic pathogen has substantial adaptive capacity, resistance and persistence in the environment, under biofilm.

The aim of this thesis work is to bring understanding on the *P. aeruginosa* behaviour in the natural mineral water distribution networks and validate the effectiveness of treatment products.

The influence of the mineral composition of 3 waters on biofilm formation capacity of 9 *P. aeruginosa* strains of various origins could be demonstrated. It appears that the amount of biofilm produced after 24 h are less important for the strong mineralization. Modulation of the production of virulence factors depending on the water quality is correlated to the specific action of certain ions and iron bioavailability. In high mineralization conditions it has been shown that organic materials promote biofilm formation of *P. aeruginosa* while metallic materials tend to disadvantage it. The efficiency of a treatment sequence of a patient point of use has been validated on the 24 h biofilm model and on all materials.

Key Words

Thermal waters, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, mineralization, materials, disinfection