



HAL
open science

Mode d'action biocide de nouveaux procédés de décontamination sur deux formes de résistances bactériennes

Esther Le Toquin

► **To cite this version:**

Esther Le Toquin. Mode d'action biocide de nouveaux procédés de décontamination sur deux formes de résistances bactériennes. Biotechnologies. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR103 . tel-02001604

HAL Id: tel-02001604

<https://theses.hal.science/tel-02001604>

Submitted on 31 Jan 2019

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES ET TECHNOLOGIE INDUSTRIELLES

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Mode d'action biocide de nouveaux procédés de décontamination sur deux formes de résistances bactériennes

Présentée et soutenue par
Esther LE TOQUIN

Thèse soutenue publiquement le 16/11/2018
devant le jury composé de

Mme Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE	Professeur d'université, AGROPARISTECH	Rapporteur
M. Daniel GILLET	Directeur de recherche, CEA Saclay	Rapporteur
Mme Sylvie CHEVALIER	Professeur d'université, Université de Rouen Normandie	Examineur
M. Pierre CHAGVARDIEFF	Directeur de recherche, CEA Cadarache	Examineur
M. François RENAUD	Professeur émérite, Université Claude Bernard Lyon1	Examineur
Mme Fabienne GAS	Ingénieure de recherche, CEA Marcoule	Encadrante
Mme Nicole ORANGE	Professeur d'université, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Sylvain FAURE	Directeur de recherche, CEA Marcoule	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Nicole ORANGE, laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement et Sylvain FAURE, laboratoire des Procédés Supercritiques et Décontamination



A ma Maman.

« Il n'y a qu'une façon d'apprendre : C'est par l'action. Tout ce que tu avais besoin de savoir, c'est le voyage qui te l'a enseigné. »

Paulo Coelho. L'Alchimiste (1988)

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes rencontrées tout au long de ma thèse. Chacune à votre façon, vous avez contribué à l'aboutissement de ce travail et à mon épanouissement durant ces trois années.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à la Région Normandie et au CEA pour avoir financé mes travaux de recherche.

Je souhaite d'abord remercier Fabienne Gas pour m'avoir fait confiance, aidé et soutenu tout au long de ces années. Ensemble nous nous sommes lancées dans cette aventure qu'est la thèse. Arrivée à destination, je me rends compte que le voyage a été superbe et en partie grâce à ta présence à mes côtés. Je remercie Nicole Orange de m'avoir fait confiance au tout début sans même me connaître. Ta gentillesse, ton engouement et ta vision des choses m'ont permis de prendre confiance en moi et en mon travail. Enfin, je remercie Sylvain Faure pour m'avoir fait partager son savoir. J'ai pris plaisir à avoir de vrais échanges avec toi sur les mousses et la biologie. Je suis fière de présenter ce travail qui est le nôtre et j'espère avoir encore l'opportunité de travailler avec vous.

Je remercie Madame Marie-Noëlle Bellon-Fontaine et Monsieur Daniel Gillet d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, ainsi que les autres membres du jury. Merci à Madame Sylvie Chevalier qui m'a toujours chaleureusement accueilli lors de mes passages au LMSM, à Monsieur Pierre Chagvardieff sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour, et à Monsieur François Renaud avec qui je prends plaisir à retravailler. Je tiens également à remercier chaleureusement Monsieur Christophe Bossuet d'avoir contribué à la création et à la réussite de ce projet et de m'avoir permis d'intégrer le CEA.

Ce travail a été réalisé grâce à la collaboration de trois laboratoires : le Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM), le Laboratoire des Procédés Supercritiques et de Décontamination (LPSD) et le Laboratoire d'Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (LI2D).

Je remercie l'ensemble des personnes du LMSM pour leur accueil, leur disponibilité et leur gentillesse. Merci à Monsieur Marc Feuilloley de m'avoir accueilli et mis à disposition le matériel du laboratoire. Je souhaite aussi remercier Madame Cathy Magnan d'avoir toujours fait le nécessaire pour mes venues et Cécile Poc pour son appui scientifique. Merci à Djouahr

de m'avoir consacré du temps. Une pensée pour tous les doctorants que j'ai rencontrés là-bas et avec qui j'ai aimé discuter de sciences et autres. Ma venue à Evreux m'a aussi permis de te rencontrer Ségolène « Ma Brenda ». Ton amitié m'a été très précieuse lors de mes passages en Normandie et je sais qu'elle durera dans le temps.

Je remercie l'ensemble du LPSD de m'avoir fait une place parmi eux lors de mes venues au laboratoire. Merci à Madame Agnès Grandjean de m'avoir accueilli et d'avoir accepté la réalisation de mes essais au sein de son laboratoire. Je remercie également Célia et Alban avec qui j'ai pris plaisir à travailler sur les gels. Un très grand merci à Fabien qui m'a facilité la vie lors de mes venues et a toujours été disponible pour moi. Enfin, Gagou, Nana, Manel, Julie et Morgane, je suis très contente de vous avoir rencontrées à l'occasion de mes venues au LPSD. Merci pour ces conversations et sorties. Nous nous verrons au prochain mariage !

Enfin, je remercie l'ensemble du Li2D. J'avoue qu'il est difficile pour moi d'écrire ces remerciements car même si ils me permettent de terminer ce manuscrit, ils signifient aussi mon départ prochain du laboratoire. J'ai passé quatre ans et demi à vos côtés et je ne saurais vous remercier pour ce que vous m'avez tous apporté. Chacun d'entre vous a contribué à l'aboutissement de ce travail et je vous en remercie tous.

Je remercie Messieurs Pierre Chagvardieff, Laurent Bellanger et Jean Armengaud pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et d'avoir accepté que j'y fasse ma thèse.

Je veux ensuite remercier plus particulièrement Charles et Pascale qui m'ont été d'un grand soutien et avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à converser. Merci à Sylvie et Béatrice pour les discussions et les bons plans sur l'art et la musique. Un grand merci à Béatrice Baus-Lagarde et Anne Chapaz pour votre accueil et votre gentillesse.

Je remercie mes co-bureaux, Sandra, Emilie, Florent, Hélène et Anastasia pour les très bons moments que nous avons passés ensemble. Merci Hélène pour tous tes conseils. Anastasia, tu me manqueras et je te manquerai mais pour que mon déchirant départ soit plus facile je te confie Licornette. Prends en soin !

Merci aux Hyènes et à Scare pour votre amitié. Vous avez enchanté mes journées. Audrey et Marie-Anne je vous souhaite que des bonnes choses pour la suite et que vous réussissiez tout ce que vous avez entrepris. Charlotte « La Plus Belle », je te remercie profondément pour toute l'aide que tu m'as apporté. Tes relectures m'ont été d'un grand

secours et ton esprit critique aiguisé m'a bien fait avancer. Votre amitié m'est importante. Je vous donne toutes rendez-vous dans le nouvel inter labo pour une revanche d'Office Volley !

Karen, je souhaite te remercier pour ta gentillesse. Je te considère comme une des plus belles rencontres que j'ai faites durant ma thèse. Je tiens aussi à remercier Mélanie, Cédric, Rémy et Charlotte avec qui j'ai passé de très bons moments et que j'aurais plaisir à revoir. Merci aussi à toute la team du gâteau du vendredi pour les bonnes pâtisseries et les bons moments échangés.

Un petit mot d'encouragement pour tous les doctorants qui devront aussi passer par cet exercice dans les prochaines années. Courage à Karim, Yannick et Virginie, ainsi qu'à Mélou et Damien. De plus, je remercie Salomé d'avoir été autonome et attentive durant le stage que j'ai eu la chance d'encadrer. J'espère que ton futur personnel et professionnel sera comblé.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier ma famille et surtout ma maman. Aucun mot n'est assez fort pour te remercier. Je préfère donc te dédier ce travail en reconnaissance de ton amour. Merci à Guy pour ton soutien. Tu m'as beaucoup aidé même sans en avoir forcément conscience. Thomas et Hélène, merci de votre amitié indéfectible et vivement nos prochaines escapades.

« Quel est dans nos cœurs ce feu. Qui pense nous même quand on dit je. Beau dans tes yeux. Débiles mais à deux ». Merci Tristan.

Table des matières

Introduction.....	3
1. Etude bibliographique	9
1.1. Premier mode de résistance bactérien étudié : La spore bactérienne	9
1.1.1. Structure et composition des différentes parties de la spore.....	9
1.1.1.1. L'exosporium	10
1.1.1.2. Le manteau	10
1.1.1.3. La membrane externe	11
1.1.1.4. Le cortex et la paroi cellulaire germinative « germ cell wall »	11
1.1.1.5. La membrane interne	12
1.1.1.6. Le core	12
1.1.2. La sporulation, mécanisme et étapes d'un mode de résistance	13
1.1.2.1. Induction de la sporulation	13
1.1.2.2. Formation de la spore bactérienne	15
1.1.3. Etapes et mécanismes de la germination	17
1.1.3.1. Activation.....	17
1.1.3.2. La germination.....	18
1.1.4. Les spores bactériennes dans notre environnement et leurs impacts	19
1.1.5. Outils de résistance des spores bactériennes à la décontamination.....	20
1.1.5.1. Les parois de la spore comme barrière de résistance.....	22
1.1.5.2. Faible hydratation, faible perméabilité et composition minérale du core	23
1.1.5.3. Le rôle protecteur de l'acide dipicolinique (DPA)	24
1.1.5.4. Protection de l'ADN par les protéines SASP et son système de réparation.....	24
1.1.5.5. Acquisition des résistances durant la sporulation.....	25
1.1.5.6. Différences de résistance suivant le terrain génétique et les conditions de sporulation	26
1.2. Les biofilms bactériens	28
1.2.1. Une composition à la fois variée et structurée.....	28
1.2.1.1. Les bactéries au sein du biofilm	28
1.2.1.2. L'exopolysaccharide (EPS)	30
1.2.1.3. Architecture d'un biofilm	31
1.2.2. Une formation en plusieurs étapes.....	32
1.2.2.1. Colonisation de la surface par les bactéries :	33
1.2.2.2. L'adhésion	35
1.2.2.3. La maturation	36
1.2.2.4. Le détachement et la recolonisation.....	36

1.2.3.	Les biofilms bactériens nous entourent et nous impactent	37
1.2.4.	La résistance des biofilms bactériens à l’environnement et aux désinfectants	40
1.3.	Les nouveaux procédés de décontamination sous forme de mousse	43
1.3.1.	Les moyens de décontamination existants	43
1.3.2.	La mousse	46
1.3.2.1.	Généralités sur les mousses aqueuses	46
1.3.2.2.	La formulation de la mousse	48
1.3.2.3.	Structure d’une mousse aqueuse.....	51
1.3.2.4.	Vie d’une mousse	52
1.3.2.5.	Rhéologie des mousses	55
1.4.	Conclusion de l’étude bibliographique et problématiques de la thèse	57
2.	Matériels et méthodes	64
2.1.	Matériels.....	64
2.1.1.	Les souches bactériennes employées au cours de l’étude	64
2.1.1.1.	Les spores	64
2.1.1.2.	Les bactéries végétatives.....	65
2.1.2.	Formulation et génération des mousses biocides de l’étude	65
2.1.2.1.	Formulation de la solution moussante.....	65
2.1.2.2.	Génération de la mousse	66
2.1.3.	Inventaire des surfaces servant de support de test	68
2.1.4.	Substances interférentes	70
2.1.5.	Substances neutralisantes	70
2.2.	Méthodes	72
2.2.1.	Techniques de culture	72
2.2.2.1.	Production de spores	72
2.2.2.2.	Production de biofilm.....	73
2.2.2.	Protocole de décontamination des spores et des bactéries végétatives	75
2.2.2.1.	Evaluation de l’efficacité de décontamination en position horizontale	75
2.2.2.2.	Evaluation de l’efficacité de décontamination en position verticale (protocole V).....	78
2.2.2.3.	Evaluation de l’efficacité de décontamination et sa cinétique en remplissage.....	80
2.2.2.4.	Tableau récapitulatif des protocoles d’évaluation de l’efficacité de décontamination des spores et bactéries végétatives par les mousse ou solutions liquides	82
2.2.4.	Protocole d’évaluation de l’efficacité de décontamination des mousses sur des biofilms bactériens	83
2.2.4.1.	Protocole de mesure de l’efficacité de décontamination par détachement et comptages des bactéries composant les biofilms	84

2.2.4.2. Protocole d'observation de l'efficacité de décontamination par la microscopie à fluorescence et confocale	85
2.3. Etude des propriétés physico-chimiques de la mousse	87
2.3.1. Etude de la mouillabilité	87
2.3.1.1. Etude de l'angle de contact d'une goutte posée sur une surface.....	87
2.3.1.2. La tension superficielle de la solution	89
2.3.2. Etude de la stabilité des mousses générées	90
2.4. Traitement statistique des données.....	92
2.4.1. Comptage des bactéries viables pour l'évaluation de l'efficacité de décontamination	92
2.4.2. Détermination de la constante d'inactivation et de la loi d'Arrhenius	92
3. Résultats et discussions.....	96
3.1. Etude des mécanismes d'action biocide des mousses sur les spores bactériennes suivant leurs différentes mises en œuvre.....	96
3.1.1. Efficacité de décontamination des surfaces contaminées en position horizontale ...	96
3.1.1.1. Sur différents matériaux d'infrastructure (protocole H).....	96
3.1.1.2. Substances interférentes (protocole H _{sali}).....	104
3.1.2. Efficacité en position verticale (protocole V)	111
3.1.3. Efficacité en remplissage	117
3.1.3.1. Cinétique de décontamination de spores libres injectées dans la solution liquide ou la mousse (R _{injectées}).....	117
3.1.3.2. Cinétique de décontamination suite à l'immersion d'un support contaminé avec des spores dans la solution liquide ou la mousse (protocole R _{support}).....	124
3.1.3.3. Efficacité de décontamination des mousses à différentes températures	136
3.1.3.4. Efficacité de décontamination suite à l'immersion d'un support contaminé avec des spores et salis par des substances interférentes dans la mousse (portocole R _{sali})	148
3.1.4. Conclusion de l'étude de l'efficacité de décontamination des mousses biocides sur les spores bactériennes suivant les différentes mises en œuvre	150
3.2. Etude des mécanismes d'action biocide des mousses biocides sur les biofilms bactériens	155
3.2.1. Adaptation du protocole de culture et d'observation des biofilms	155
3.2.1.1. Choix de la technique de lavage et de la technique de détachement du biofilm.....	155
3.2.1.2. Choix du support	156
3.2.1.3. Choix de la souche.....	158
3.2.1.4. Choix des conditions de formation du biofilm	159
3.2.1.5. Mise au point de la technique de dépôt des microorganismes pour effectuer les comptages bactériens	161
3.2.1.6. Mise au point de la technique de coloration et d'utilisation du microscope confocal....	163

3.2.2. Efficacité des procédés de décontamination sur les biofilms bactériens	166
3.2.2.1. Différence d'efficacité entre le traitement par la solution liquide et celui par la mousse	166
3.2.2.2. Transfert des bactéries du biofilm dans la mousse	170
3.2.2.3. Evaluation du temps de contact entre la mousse et le biofilm.....	172
3.2.2.4. Efficacité de décontamination de la mousse NaOCl sur différents matériaux en position horizontale et en remplissage	174
3.2.3. Conclusion de l'étude d'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms bactériens	176
4. Conclusions et perspectives	181
Annexe 1	189
Annexe 2	207
Annexe 3	215
Références.....	227

Table des figures

Figure 1. Schématisation de la structure de la spore bactérienne (Leggett, McDonnell et al., 2012)..	10
Figure 2. Schéma du processus d'initiation de la sporulation (Tojo, Hirooka et al., 2013).....	14
Figure 3 Les différentes étapes de la sporulation (McDonnell and Russell, 1999, Driks, 2002)	15
Figure 4 Les différentes étapes de la germination d'une spore bactérienne (Nguyen Thi Minh, Dantigny et al., 2010).....	17
Figure 5. Images MEB de biofilms de <i>Lactococcus lactis</i> OSM31 (a et b) et <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (c et d) formés en 24h à 30°C dans une chambre à flux. Les flèches en image b indiquent l'exopolysaccharide entre les bactéries (Briandet, Lacroix-Gueu et al., 2008)	28
Figure 6. Schéma des étapes de la formation du biofilm, de l'adhésion à la dissémination des bactéries, par T. Meylheuc (Briandet, 2012).....	33
Figure 7. Gradient de fraction liquide dans la mousse avec des mousses plus sèches sur le dessus et plus humides en bas sous l'effet du drainage (initialement la mousse peut être homogène).....	47
Figure 8. Représentation schématique du comportement des tensioactifs suivant leur concentration dans la solution et son effet sur la tension de surface à l'interface air-liquide (Langevin, 1998)	49
Figure 9. Structure d'une mousse avec une représentation schématique des jonctions de Plateau, bords de Plateau et film liquide	51
Figure 10. Bactéries de <i>Bacillus thuringiensis</i> ; a) forme végétative ; b) forme sporulée.....	64
Figure 11. Structure chimique d'un Alkyl polyglycoside	65
Figure 12. Structure chimique de la gomme Xanthane.....	66
Figure 13. Image du générateur à mousse Serv'Instrument au laboratoire LPSD et Li2D.	67
Figure 14. Schéma de fonctionnement du générateur à mousse	67
Figure 15. Schéma du protocole de formation des biofilms bactériens sur support.....	74
Figure 16. Schéma du protocole H de décontamination sur différents supports en position horizontale	76
Figure 17. Schéma du protocole H _{salin} de décontamination avec une substance interférente en position horizontale	77
Figure 18. Schéma du protocole V de décontamination sur polystyrène avec des spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> en position verticale	79
Figure 19. Schéma du protocole R _{injectées} de décontamination des spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> déposées directement dans la mousse ou la solution liquide à 20°C	80
Figure 20. Schéma du protocole R _{support} de décontamination sur polystyrène avec des spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> en remplissage avec le support à la verticale.....	81
Figure 21. Schéma du protocole de décontamination des biofilms avec une photographie du microscope à fluorescence et confocal de Nikon au Li2D de Marcoule	84
Figure 22. Schéma du fonctionnement de la microscopie : a) à fluorescence ; b) confocale.....	85
Figure 23. a) tensiomètre à goutte posée Krüss (DSA 30) au LMSM d'Evreux ; b) dépôt d'une goutte de solution liquide contenue dans la seringue sur un disque en acier inoxydable	87
Figure 24. Schéma de mesure de l'angle θ entre un support et une goutte de solution liquide	88
Figure 25. Dépôt de goutte d'hexadécane : a) sur une lame en acier inoxydable ; b) sur une lame en polystyrène.....	89
Figure 26. Dépôt de goutte d'eau Volvic : a) sur un carreau de faïence ; b) sur une lame en polystyrène	89
Figure 27. Tensiomètre à anneau de Noüy : a) image de tensiomètre Krüss du LPSD ; b) schéma de l'effet de la montée de l'anneau sur la surface du liquide (Schéma de l'Université du Québec à Chicoutimi)	89

Figure 28. Colonne Foamscan du LPSD après insertion de la mousse : a) température ambiante ; b) avec une mousse à environ 32°C.....	91
Figure 29. Exemple de photographie d'une mousse dans la colonne prise par la caméra CSA : a) 5 minutes après le commencement de l'essai ; b) après 109 minutes ; c) après 325 minutes	91
Figure 30. Pourcentage de récupération après traitement des spores de Bt sur différents matériaux par la mousse neutre.....	97
Figure 31. Efficacité de décontamination des mousses NaOCl 5% et H ₂ O ₂ 12% de 5,7% de fraction liquide et contenant 3 g/L de Xanthane, sur différents matériaux contaminés par des spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> après 30 minutes d'action en position horizontale	98
Figure 32. Angles θ en degrés observés entre la goutte posée et la surface du matériau pour les solutions moussantes liquides NaOCl 5% et H ₂ O ₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane	99
Figure 33. Schéma du mouillage d'un support en position horizontale par une mousse aqueuse	100
Figure 34. Goutte de la solution H ₂ O ₂ sur support mortier.....	101
Figure 35. Efficacité de décontamination des mousses NaOCl 5% et H ₂ O ₂ 12% sur différents matériaux contaminés par des spores de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> après 30 minutes d'action en position horizontale	102
Figure 36. Efficacité de décontamination en réduction de log des mousses NaOCl 5% et H ₂ O ₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane en 30 minutes de contact, sur des supports en position horizontale contaminés par des spores de Bt et encrassés par de la BSA séchée ou liquide	105
Figure 37. Efficacité de décontamination en réduction de log des mousses NaOCl 5% et H ₂ O ₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane en 30 minutes de contact, sur des supports en position horizontale contaminés par des spores de Bt et salis par de l'argile séchée ou de l'huile de moteur	108
Figure 38. Goutte posée sur un support en polystyrène recouvert par de l'huile de moteur : a) Solution Neutre ; b) Solution H ₂ O ₂ ; c) Solution NaOCl	109
Figure 39. Dépôt d'une goutte de la solution NaOCl sur de l'argile séchée sur un support en polystyrène.	109
Figure 40. Réduction du nombre de spores sur un support en polystyrène en position verticale suite à un contact de 30 minutes avec les mousses NaOCl 5% et H ₂ O ₂ 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane.	111
Figure 41. Essais de décontamination en position verticale de 3 supports traités avec une mousse NaOCl 5% contenant 3 g/L de Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T ₀) et b) après 30 minutes de temps de contact.....	112
Figure 42. Essais de décontamination en position verticale de 3 supports traités avec une mousse H ₂ O ₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T ₀) ; b) après 15 minutes de contact et c) après 30 minutes.....	113
Figure 43. Schéma du mouillage d'un support en position verticale par une mousse aqueuse talochée	113
Figure 44. Essais de décontamination en position verticale d'un premier support traité avec une mousse neutre sans Xanthane et de 3 supports traités avec une mousse NaOCl 5% sans Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T ₀) et b) après 30 minutes de temps de contact.....	115
Figure 45. Essais de décontamination en position verticale d'un premier support traité avec une mousse neutre contenant 3 g/L de Xanthane et de 3 supports traités avec une mousse H ₂ O ₂ 12% sans Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T ₀) ; b) après 20 minutes de contact et c) après 30 minutes.....	115
Figure 46. Cinétique de décontamination en remplissage sans support des solutions liquides NaOCl à 2,5% et 11 g/L de Glucopon®, contenant ou non 3 g/L de Xanthane, à température ambiante.....	118
Figure 47. Cinétique de décontamination en remplissage sans support des solutions liquides H ₂ O ₂ à 12% contenant 3 g/L de Xanthane ou sans Xanthane ou sans additifs à température ambiante.....	119

Figure 48. Comparaison de la cinétique de décontamination en remplissage sans support entre les mousses NaOCl à 2,5%, contenant 3 g/L de Xanthane ou sans Xanthane, à température ambiante	121
Figure 49. Comparaison de l'efficacité de décontamination en remplissage sans support entre les mousses NaOCl à 2,5% et 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane, à température ambiante après 20 minutes de contact.....	122
Figure 50. Comparaison de la cinétique de décontamination en remplissage sans support entre les solutions liquides et les mousses H ₂ O ₂ à 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante	124
Figure 51. Quantité de spores en log récupérées toutes les cinq minutes, sur le support immergé à la verticale et après transfert dans une mousse ou une solution liquide sans désinfectant mais avec 3 g/L de Xanthane	125
Figure 52. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les solutions liquides H ₂ O ₂ 12% contenant ou non des additifs à température ambiante	127
Figure 53. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les mousses H ₂ O ₂ 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante.....	128
Figure 54. Comparaison de la cinétique de décontamination des spores transférées dans la mousse H ₂ O ₂ 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane lors des essais de remplissage avec support à température ambiante.....	129
Figure 55. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les solutions liquides NaOCl à 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante.	130
Figure 56. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les mousses NaOCl à 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante.	131
Figure 57. Comparaison de la cinétique de décontamination des spores transférées dans la mousse NaOCl 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane lors des essais de remplissage avec support à température ambiante.....	132
Figure 58. Etude du drainage des mousses NaOCl, H ₂ O ₂ et neutre contenant ou non du Xanthane grâce à un appareil Foamscan à température ambiante.....	133
Figure 59. Schéma du mouillage d'un support immergé dans la mousse en position verticale.....	135
Figure 60. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 4°C pour les mousses et solutions liquides de NaOCl à 2,5% et H ₂ O ₂ 12% avec et sans Xanthane et sans additifs en 25 minutes de temps de contact.....	137
Figure 61. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 4°C pour les mousses NaOCl à 2,5% et 5% avec et sans Xanthane en 25 minutes de temps de contact.....	139
Figure 62. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 30°C pour les mousses et solutions liquides de NaOCl 2,5% et H ₂ O ₂ 12% avec et sans Xanthane et sans additifs en 25 minutes de temps de contact.....	140
Figure 63. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 30°C pour les mousses NaOCl à 2,5% et 5% avec et sans Xanthane en 25 minutes de temps de contact.....	142
Figure 64. Comparaison de la réduction du nombre de spores en log sur le support à 4°C, 20°C et 30°C pour les mousses H ₂ O ₂ à 12% et NaOCl 5% avec et sans Xanthane en 25 minutes de temps de contact	143
Figure 65. Comparaison du drainage à 20°C et 30°C des mousses NaOCl, H ₂ O ₂ et neutre ne contenant pas de Xanthane, grâce à un appareil Foamscan	144
Figure 66. Comparaison du drainage à 20°C et 30°C des mousses NaOCl, H ₂ O ₂ et neutre contenant du Xanthane à 3 g/L, grâce à un appareil Foamscan.....	144
Figure 67. Etude de la loi d'Arrhenius en fonction de la température et de la constante d'inactivation des spores par les mousses H ₂ O ₂ 12% et NaOCl 5% avec ou sans Xanthane	146

Figure 68. Efficacité de décontamination en réduction de log des mousses NaOCl 5% et H ₂ O ₂ 12% avec 3 g/L de Xanthane remplissant un tube contenant un support en position verticale contaminé par des spores de Bt et salis par de la BSA séchée.	149
Figure 69. Comparaison de la récupération de bactéries en fonction de deux techniques de détachement et de lavage sur des biofilms formés sur des lamelles en boîte de Petri	155
Figure 70. Comparaison de la récupération des bactéries d'un biofilm de PA14 de 24h en fonction des quatre supports étudiés	157
Figure 71. Comparaison de la récupération des bactéries d'un biofilm de PA14 et MF37 en fonction de deux supports Lab-Teks® à puits détachable ou flask.....	158
Figure 72. Biofilm de 24h formé en Lab-Tek® à puit à partir de bactéries de PA14 (images 3D acquises en microscopie confocale (excitation à 488 nm))	159
Figure 73. Biofilms de bactéries PA14 marquées au Syto-9 ; images 3D (a) et axe X (b) acquises à partir de la microscopie confocale	161
Figure 74. Comparaison de la récupération des bactéries de biofilm de PA14 sur support Lab-Tek flask®, en fonction du temps d'incubation et de deux types de dépôts des bactéries sur les géloses de LB agar dans les boîtes de Petri	162
Figure 75. Bactéries d'un biofilm PA14 marquées au kit Live/Dead après traitement avec une mousse H ₂ O ₂ ; images 3D acquises à partir de la microscopie confocale a) excitation à 488 nm ; b) excitation à 514 nm ; c) excitations à 514 et 488 nm	164
Figure 76. Bactéries de PA14 traitées par H ₂ O ₂ et marquées par le kit Live/Dead ; a) image 2D acquise à partir de la microscopie optique et b) images 2D acquises à partir de la microscopie à fluorescence avec comme émission 460-500 nm.....	164
Figure 77. Bactéries de PA14 non marquées ; a) et b) images 2D acquise à partir de la microscopie à fluorescence (émission à 465-495 nm)	165
Figure 78. Réduction du nombre de bactéries PA14 en log après traitement du biofilm par les solutions liquides ou mousses H ₂ O ₂ et NaOCl en 4 heures de temps de contact	166
Figure 79. Biofilm de bactéries PA14 en image 2D acquise à partir de la microscopie optique : a) après traitement avec la solution liquide NaOCl ; b) après traitement avec la solution liquide neutre (grossissement x 60).....	168
Figure 80. Biofilm de bactéries PA14 en image 2D acquise à partir de la microscopie optique : a) après traitement avec la mousse NaOCl ; b) après traitement avec la mousse neutre (grossissement x 60)	168
Figure 81. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c)après traitement par la solution liquide H ₂ O ₂ , images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement par la solution liquide neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale.....	169
Figure 82. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c) après traitement par la mousse H ₂ O ₂ , images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement par la mousse neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale	169
Figure 83. Réduction du nombre de bactéries PA14 en log transférées dans la mousse ou adhérentes au support, après traitement du biofilm par les mousses H ₂ O ₂ et NaOCl en 4 heures de temps de contact.....	171
Figure 84. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c) après traitement de 1h par la mousse H ₂ O ₂ , images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement de 1h par la mousse neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale	173

Figure 85. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c) après traitement de 4h par la mousse H ₂ O ₂ , images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement de 4h par la mousse neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale	173
Figure 86. Efficacité de décontamination de la mousse NaOCl 5% sur différents supports contaminés par des biofilms de PA14 après une heure d'action en position horizontale ou en remplissage	175

Table des tableaux

Tableau 1. Mécanismes de survie de la spore face aux traitements physiques et chimiques (<i>Nicholson, Munakata et al., 2000, Tennen, Setlow et al., 2000, Melly, Cowan et al., 2002, Young and Setlow, 2003, Young and Setlow, 2004, Setlow, Atluri et al., 2006, Setlow, 2006, Setlow, 2007, Reineke, Mathys et al., 2013</i>).....	21
Tableau 2. L'efficacité de désinfection des principaux désinfectants.....	44
Tableau 3. Récapitulatif des configurations des essais de décontamination avec une substance interférente	78
Tableau 4. Récapitulatif des protocoles d'évaluation de l'efficacité de décontamination des spores par les mousses ou solutions liquides	83
Tableau 5. Résultats des observations en microscopie à fluorescence et confocale des biofilms suivant différents protocoles de formation (x : critères non respectés et ✓ : critères respectés).....	160

Nomenclature

γ : Tension interfaciale

γ_{LV} : Tension interfaciale liquide-vapeur

γ_{SL} : Tension interfaciale solide-liquide

γ_{SV} : Tension interfaciale solide-vapeur

η_d : Propriété de viscosité

σ : Facteur sigma

θ : Angle de contact

τ_y : Contrainte seuil

A_0 : Facteur de fréquence

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ATP : Adénosine Tri Phosphate

ARN : Acide Ribonucléique

BSA : Bovin Serum Albumin (Sérum d'Albumine Bovine)

Bt : *Bacillus thuringiensis*

Bs : *Bacillus subtilis*

C : Concentration

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CLE : Enzyme lytique du complexe

CFU : Colony-Forming Unit ou Unité Formant Colonie

CMC : Concentration micellaire critique

d : Densité

DEN : Direction de l'Énergie Nucléaire

DO : Densité optique

DPA : Acide 2,6-pyridinecarboxylique ou Acide dipicolinique

DRF : Direction de la Recherche Fondamentale

E_a : Énergie d'inactivation

E_d : Élasticité de la mousse

Eh : *Enterococcus Hirae*

EPA : Agence de Protection Environnementale Américaine

EPS : Exopolysaccharide

GFP : Green Fluorescent Protein

Gs : *Geobacillus stearothermophilus*

GTP : Guanosine Tri Phosphate

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HSL : Homoserine lactone

k : Constante de vitesse d'inactivation

Kin : Histidine kinase

LB : milieu Luria-Bertani

LSPD : Laboratoire des Procédés Supercritiques et Décontamination

LI2D : Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic

LMSM : Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement

LR : Log Reduction (Réduction de log)

M : Masse Molaire

MAL : Delta-lactame-muranique

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MF37 : *Pseudomonas fluorescens* numéro de souche

N : CFU_t à l'instant t

N₀ : CFU_{neutre}

NaCl : Chlorure de sodium

NaOCl : Hypochlorite de sodium

PA14 : *Pseudomonas aeruginosa* numéro de souche

PBS : Tampon phosphate salin

R : Constante des gaz parfaits

r_a : Rayon extérieur

RG : Récepteurs de la germination

r_i : Rayon intérieur

rpm : rotation par minute

SASP : Small Acid Soluble Proteins

SP : Photo-produits de spore

Sa : *Staphylococcus aureus*

St : *Salmonella enterica typhimurium*

TSA : Tryptone Soja et Agar

TSB : Bouillon Tryptone Soja

UV : Ultra-violet

V : Volume

V_L : Volume de liquide

V_M : Volume de mousse

Introduction

Introduction

Les microorganismes représentent la majeure partie de la biomasse totale de la matière vivante de notre planète. Ils regroupent les levures, les algues, les champignons, les protozoaires ainsi que l'ensemble des bactéries. Ces dernières sont une composante essentielle de notre environnement et de notre organisme. Cependant certaines bactéries peuvent être néfastes et sont capables de déployer des mécanismes de résistance afin de survivre à des conditions environnementales défavorables. Deux de ces mécanismes de résistances sont la formation de spores et la génération de biofilms.

La majorité des bactéries (80% de la biomasse bactérienne (*Davies, 2003, Richards and Melander, 2009*)) est capable de survivre en formant des biofilms. Les bactéries sous forme planctonique adhèrent sur une surface ou se mettent à une interface air/liquide où elles forment alors des amas structurés et produisent une matrice protectrice d'exopolysaccharides (EPS). Ces biofilms sont présents sur de nombreuses surfaces biotiques ou abiotiques de notre quotidien comme les parois de la douche ou même sur les dents (*Fernandes, Bhavsar et al., 2018*). Dans le domaine hospitalier, les biofilms se développent sur le matériel médical (cathéters, pacemakers, prothèses, sondes, ...) et deviennent un réservoir de bactéries à l'origine de maladies dites nosocomiales (*Santos, Watanabe et al., 2011*). Dans celui de l'agroalimentaire, ils se développent sur les surfaces en contact avec les aliments tout au long de la chaîne de production provoquant de graves toxi-infections (*Galie, Garcia-Gutierrez et al., 2018*).

Certaines bactéries appartenant notamment aux genres *Bacillus* et *Clostridium*, ont la capacité de déclencher un processus appelé sporulation. Elles vont alors passer dans un état de dormance (activité métabolique quasi inexistante) et s'entourer de couches protectrices leur permettant de survivre plusieurs années dans des milieux défavorables sous forme de spores (*Postgate, 1990*). Elles retrouvent un état actif dit végétatif, grâce au processus de germination en retournant dans un milieu plus propice à leur croissance. Ces spores sont un enjeu majeur dans l'agroalimentaire où elles peuvent être à l'origine de toxi-infections sévères car certaines peuvent résister aux températures de stérilisation. Dans le domaine de la Défense, les spores sont classées comme potentielles armes biologiques. Elles ont déjà été utilisées lors d'attentats terroristes comme celui de 2001 aux Etats-Unis, où des lettres

contenant des spores de *Bacillus anthracis* (agent responsable de l'anthrax) ont causé la mort de 5 personnes et environ 300 millions de dollars de coût en décontamination (*Schmitt and Zacchia, 2012*).

Garantir l'efficacité d'inactivation de ces agents bactériens est donc l'objectif lors d'une opération de décontamination (réduction de 7 à 4 logs suivant le domaine). Cependant, les spores bactériennes sont capables de résister aux traitements physiques tels que la chaleur et les radiations UV, ainsi qu'aux traitements chimiques usuels, grâce à des moyens de protections qui leurs sont propres, comme une faible perméabilité et une forte protection de l'ADN (*Nicholson, Munakata et al., 2000, Young and Setlow, 2003, Reineke, Mathys et al., 2013*). De même, les bactéries au sein du biofilm sont protégées par une matrice d'EPS, leur permettant d'acquérir une résistance aux antibiotiques et aux désinfectants (*Ghafoor, Hay et al., 2011*). Les professionnels des secteurs touchés par ces contaminations doivent donc disposer de techniques de décontamination efficaces et facilement employables sur ces micro-organismes résistants. La contamination ne se restreint pas aux surfaces horizontales et faciles d'accès (sols), ces nouvelles techniques de décontamination doivent permettre de décontaminer tous les types de surfaces (verticales et obliques) d'infrastructures (wagons, bureaux, cuves, systèmes de ventilation, ...). L'utilisation de sprays liquides désinfectants présente l'inconvénient d'avoir un temps de contact limité (quelques minutes) sur ces formes de résistances pour décontaminer entièrement les surfaces verticales. De même, l'emploi d'outils nécessitant un contact direct avec la contamination (lingettes) est inutilisable en cas de contamination de zones difficiles d'accès.

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet du Commissariat à l'Energie Atomique de Marcoule (CEA). Le CEA a commencé les recherches en 2000, sur des techniques de décontamination radioactives par des mousses à faible humidité contrôlée permettant à la fois de réduire la quantité de liquide utilisée et d'augmenter le temps de contact sur les surfaces (*Faure, Fournel et al., 2002*). Plus récemment, des formulations de mousse biocide ont fait l'objet d'un brevet (*Faure, Le Toquin et al., 2016*), puis d'un financement de thèse pour une approche plus duale. L'objectif est de pouvoir cibler aussi les domaines de la santé et de l'agroalimentaire avec l'ajout du modèle des biofilms dans les études d'efficacité de décontamination. La mousse biocide peut être employée en talochage sur des surfaces contaminées ou en remplissage dans des espaces clos ou mi-clos difficilement accessibles à

l'homme (tuyaux, bouches d'aération, grandes cuves ...). Les mousses sont adaptées aux opérations de décontamination des sites où l'accès est difficile (tuyaux, plafonds, murs avec ou sans fissures, zones situées derrière les équipements, ...) grâce à leur stabilité en remplissage, leur récupération facilitée après utilisation et leur besoin faible en matières premières nécessaires. Dans ce contexte, le travail de thèse doit permettre d'approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action de ces mousses de décontamination biocides sur les formes de résistance bactérienne tels que les spores et les biofilms. Le travail est réalisé entre le Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) d'Evreux et le CEA. De plus, au sein même du CEA, deux équipes collaborent au projet de thèse : le Laboratoire d'Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (LI2D) de la Direction de la Recherche Fondamentale (DRF) et le Laboratoire des Procédés Supercritiques et de Décontamination (LPSD) de la Direction de l'Energie Nucléaire (DEN).

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique sur les spores, les biofilms et les moyens de décontamination existants en détaillant les propriétés physico-chimiques des mousses. Dans un premier temps est décrit la structure, le mode de vie, l'impact et les moyens de résistance de la spore bactérienne puis du biofilm. Une partie sur les moyens de décontaminations existants permet d'introduire les deux désinfectants utilisés dans cette étude (le peroxyde d'hydrogène et l'hypochlorite de sodium). Ces désinfectants ont été choisis suivant différents critères de performance comme la vitesse d'efficacité du produit ou son efficacité de décontamination comme la diminution des bactéries de 7 logs et sa compatibilité avec les matériaux de construction. Enfin, le chapitre termine sur une présentation des notions physico-chimiques des mousses abordées dans ce travail.

Le deuxième chapitre expose les matériels et les techniques employés afin d'étudier les modes d'action des mousses biocides et répondre aux questions posées en début de thèse : quelles sont leur efficacité, comment réagissent-elles sur les surfaces, à quelle vitesse et quels sont les facteurs influençant leur efficacité ? Ce chapitre recense les protocoles et matériels ayant permis la production et l'évaluation de l'efficacité de décontamination des spores et des biofilms. Cette évaluation a été réalisée avec des supports traités en position horizontale ou en position verticale, ainsi que des essais où le support contaminé est placé à la verticale dans de la mousse (remplissage). La microscopie confocale permet de compléter l'utilisation du comptage bactérien pour mesurer l'efficacité de décontamination des mousses sur les

biofilms. De plus, des appareils de tensiométrie et de caractérisation des mousses ont été utilisés afin d'apporter des explications propres à l'action des mousses sur les bactéries.

Le troisième chapitre rassemble les résultats majeurs obtenus. La première partie permet de discuter de l'efficacité de décontamination des mousses sur les spores en suivant les différents protocoles de mise en œuvre des mousses (position horizontale, verticale et remplissage). Notamment en remplissage, une étude de la cinétique de la réaction d'inactivation des spores par les mousses a été menée. L'objectif est de savoir si la mousse agit de manière instantanée et rapide. La seconde partie présente l'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms après la mise en place d'un protocole adapté.

Enfin, une conclusion générale de l'ensemble des travaux permet de dégager à la fois les points académiques essentiels ainsi que les recommandations d'utilisation des mousses, avant de terminer sur les perspectives.

Etude bibliographique

1. Etude bibliographique

Dans cette partie bibliographique, nous présenterons séparément pour chacune des deux formes de résistance bactérienne, leur structure, leur mode de vie, leur impact dans l'environnement et leur mode de résistance. A la suite du chapitre sur les spores et celui sur les biofilms, nous exposerons les moyens de décontamination biologiques existants, en détaillant plus particulièrement l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène, les deux biocides utilisés dans notre étude. Enfin des notions sur la génération et les caractéristiques physico-chimiques des mousses seront abordées en fin de ce chapitre.

1.1. Premier mode de résistance bactérien étudié : La spore bactérienne

Certaines bactéries Gram-positif comme les *Bacillus spp.* et les *Clostridium spp.*, sont capables en cas de stress environnemental comme le manque de nutriments de passer dans un état de dormance en modifiant leur structure. Ces bactéries qualifiées de spores bactériennes peuvent survivre dans cet état pendant plusieurs années (*Leggett, McDonnell et al., 2012*). Cette partie détaille la structure de la spore, les processus permettant sa dormance et son retour à un métabolisme actif, ainsi que son impact sur notre environnement et ses moyens de résistance.

1.1.1. Structure et composition des différentes parties de la spore

La composition chimique et la structure de la spore diffèrent considérablement de celle de la bactérie sous forme végétative. Cependant, seule la présence de la couche la plus externe, l'exosporium diverge entre les différentes espèces bactériennes sporulantes (*Edwards, Karim et al., 2016*). La spore est structurée en de multiples couches, illustrées en Figure 1.

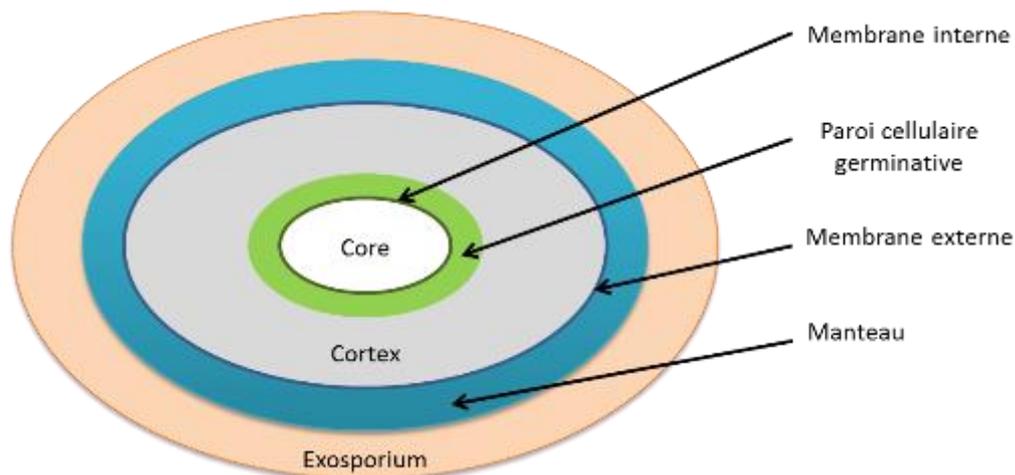


Figure 1. Schématisation de la structure de la spore bactérienne (Leggett, McDonnell et al., 2012).

1.1.1.1. L'exosporium

L'exosporium d'une épaisseur de 25 à 40 nm est la couche la plus extérieure de la spore et sa présence n'est pas universelle. Cette structure se retrouve chez des *Bacillus* et *Clostridium* comme *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *Cl. Difficile* (Todd, Moir et al., 2003, Pizarro-Guajardo, Calderon-Romero et al., 2016) mais peut être absente ou grandement réduite chez certaines espèces comme *B. subtilis* (Waller, Fox et al., 2004). Elle est composée principalement de protéines (52% de la fraction de l'exosporium chez *B. cereus*) ainsi que de lipides, polysaccharides et des composés tels que le calcium et le magnésium (Matz, Beaman et al., 1970). Cette couche serait impliquée dans les propriétés d'adhésion de la spore sur les supports tels que l'acier et la restriction d'accès des antibiotiques au manteau (Henriques and Moran, 2007, Joshi, Phillips et al., 2012). De plus, des études sur des bactéries d'espèce *Bacillus* ont démontré un lien entre la présence d'exosporium et l'hydrophobie des spores (Kjelleberg, 1984).

1.1.1.2. Le manteau

Le manteau est une structure complexe composée d'une série de fines couches de 30 à 80 protéines spécifiques de la spore. Le nombre de protéines varie en fonction de la bactérie mais peut représenter 50% à 80% des protéines totales de la spore (Aronson and Fitz-James, 1976). Il est divisé en une enveloppe interne peu dense d'environ 20 à 30 nm et d'une enveloppe externe plus épaisse d'environ 40 à 90 nm. Ces deux enveloppes sont différenciables en microscopie électronique grâce à leur densité (Warth, Ohye et al., 1963).

L'hydrophobie des spores est supérieure à celle des bactéries sous forme végétative. Cette différence d'hydrophobie est due aux nombreuses protéines présentes dans le manteau et dans l'exosporium et qui le sont moins à la surface des cellules végétatives à Gram-positif (Doyle, Nedjathaiem et al., 1984). Enfin, le manteau joue un rôle important dans la protection de la spore face aux agressions chimiques et physiques. Nous détaillerons ce rôle de protection dans la partie 1.1.4.

1.1.1.3. La membrane externe

La membrane externe est la paroi jouxtant le manteau. Cette membrane est une barrière perméable permettant le passage de produits nécessaires à la germination de la spore vers la membrane interne où sont localisés les récepteurs (Leggett, McDonnell et al., 2012).

1.1.1.4. Le cortex et la paroi cellulaire germinative « germ cell wall »

Sous la membrane externe se trouve deux couches de peptidoglycanes, le cortex et le « germ cell wall » ou paroi cellulaire germinative. Le cortex est une couche épaisse de peptidoglycanes structurellement proche de la paroi de la bactérie végétative mais avec plusieurs modifications spécifiques à la spore (Popham, 2002). La plus importante est la présence d'acides delta-lactam-muramiques et d'enzymes sous forme inactive. L'étude de Atrih et al. de 1998 cite les enzymes SleB et CwlJ comme catalyseurs de l'hydrolyse du cortex au cours de la germination (Atrih, Zollner et al., 1998). Le cortex est essentiel dans la formation de la spore. Il joue un rôle dans le maintien de la structure face à la forte pression osmotique générée par la concentration importante en solutés dans le core (Cowan, Olivastro et al., 2004). Sa dégradation lors de la germination est essentielle pour l'expansion du core et donc de la croissance de la bactérie sous forme végétative (Setlow, 2003).

Peu épaisse, le « germ cell wall » a une constitution différente du cortex en particulier par l'absence d'acides delta-lactam-muramiques. L'abondance de ce résidu dans le cortex permet une dégradation sélective de celui-ci mais pas de la paroi cellulaire germinative (Gilmore, Bandyopadhyay et al., 2003). Cette dernière devient alors la paroi de la bactérie lors de la germination de la spore (Leggett, McDonnell et al., 2012). D'après l'article de Setlow (2006), sa structure semble identique à celle de la bactérie sous forme végétative.

1.1.1.5. La membrane interne

La membrane interne de la spore a une composition en phospholipides et acide gras similaire à celle de la membrane plasmique de la bactérie végétative. Cependant, sa composition en protéines est différente, en particulier par la présence des récepteurs de la germination et de la protéine SpoVA dans la membrane interne de la spore (Setlow, 2003). De plus, sa structure est beaucoup plus compressée et immobile. Les lipides constituant la membrane sont en majorité figés quand la bactérie est sous forme de spore mais redeviennent mobiles lors de la germination (Cowan, Olivastro et al., 2004). Par cette immobilité, la membrane interne est peu perméable aux petites molécules comme les méthylamines et l'eau qui pénètrent peu dans le core (Sunde, Setlow et al., 2009).

1.1.1.6. Le core

Le core est la partie centrale de la spore. Il est composé d'ADN, d'ARN, de ribosomes et d'enzymes spécifiques aux besoins de la spore (Setlow, 2006). L'une des particularités de la composition du core est sa faible quantité en eau. Là où elle atteint 75 à 80% du poids sec du core dans la cellule végétative, elle n'est comprise qu'entre 27 et 55% dans celui de la spore suivant les espèces (Beaman and Gerhardt, 1986). Elle dépend en partie des conditions de sporulation telles que la température ou la composition du milieu qui deviennent hostiles pour la survie bactérienne. Il a été démontré que plus la température de sporulation est haute, plus la quantité en eau est faible dans la spore (Melly, Genest et al., 2002). Cette faible teneur en eau libre entraîne une restriction des mouvements des macromolécules au sein du core. Cette particularité est primordiale dans l'état de dormance enzymatique de la spore. Durant les cinq premières minutes de la germination, le core reçoit une importante quantité d'eau permettant la restauration de la mobilité des macromolécules et des enzymes (Cowan, Koppel et al., 2003). La faible quantité en eau dans le core de la spore peut être imputée à sa très forte teneur en minéraux tels que l'acide 2,6 pyridinedicarboxylique (acide dipicolinique ou DPA). En effet, des études ont démontré que la quantité d'eau dans le core des spores mutantes sans DPA est plus importante (Paidhungat, Setlow et al., 2000). L'acide dipicolinique représente 5 à 15% du poids sec total de la spore et se situe uniquement dans le core (Coleman, De et al., 2007). Il se trouve le plus souvent sous forme chélaté avec des cations divalents dont majoritairement le Ca^{2+} formant le complexe DPA- Ca^{2+} (Setlow, 2006). Ce complexe est très vite excrété par la spore au moment de l'amorçage de la germination

(Setlow, 2013). Enfin, il existe au sein du core des petites protéines appelées « Small Acid Soluble Proteins » (SASP) de type α et β . Ces protéines sont synthétisées tardivement au cours de la sporulation et sont dégradées rapidement lors de la germination (Hayes and Setlow, 2001). Elles se retrouvent exclusivement dans le core de la spore où elles saturent l'ADN, permettant à celui-ci de passer à une forme condensée en anneau qui le protège (Tennen, Setlow et al., 2000, Setlow, Atluri et al., 2006). Les rôles de ces molécules dans la résistance de la spore lors des essais de décontamination seront étudiés dans la partie 1.1.4.

L'ensemble de cette structure multicouche de la spore lui confère une résistance importante face aux traitements désinfectants. Les résistances acquises par chaque couche de la spore sont détaillées en partie 1.1.4.

1.1.2. La sporulation, mécanisme et étapes d'un mode de résistance

La sporulation est le processus permettant à la bactérie de passer dans un état de dormance et d'acquérir la structure multicouche. Lors de ce processus, la composition et la structure des bactéries changent radicalement pour se protéger et résister aux antibiotiques, aux désinfectants et à un environnement défavorable.

1.1.2.1. Induction de la sporulation

Lorsque le milieu devient trop défavorable, les bactéries capables de sporuler vont pouvoir initier cet ultime processus (Hamon and Lazazzera, 2001). La sporulation est généralement stimulée par un manque de nutriments (carbone ou azote), une absence d'oxygène, ou à des températures extrêmes, ou tout autre stress, ainsi que par une surpopulation bactérienne dans le milieu. Deux facteurs rentrent en jeu dans le déclenchement de la sporulation (Figure 2).

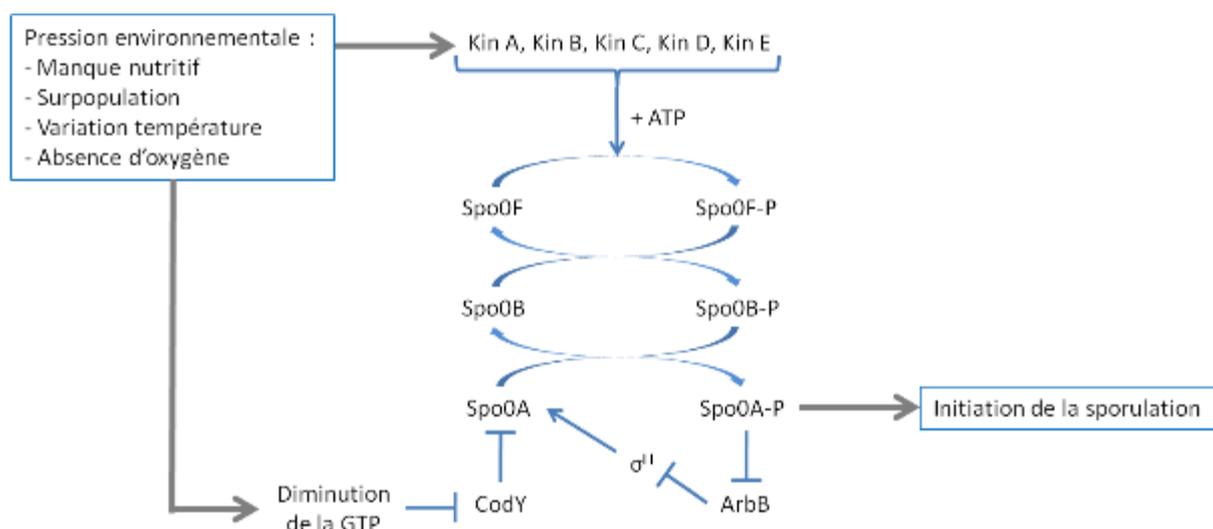


Figure 2. Schéma du processus d'initiation de la sporulation (Tojo, Hirooka et al., 2013)

Le premier facteur est la synthèse en quantité importante d'une protéine appelée Spo0A. Cette protéine est induite et transcrite durant la fin de la phase exponentielle de croissance des cellules végétatives grâce au facteur sigma (σ^H) qui induit l'expression du gène *spo0A* (Stragier and Losick, 1996). Dans l'environnement, la production de cette protéine se fait en faible quantité car des gènes (*abrB* et *codY*) inhibent sa synthèse. Lorsque le milieu s'appauvrit, le niveau de GTP devient bas engendrant l'arrêt de la répression des gènes *abrB* et *codY* par cette protéine régulatrice (Sonenshein, 2000) et donc de permettre l'expression de Spo0A.

Ensuite quand la quantité en Spo0A devient suffisante pour être détectée par les récepteurs membranaires spécifiques, elle enclenche une cascade de phosphorylations par des systèmes à deux composants. Un phosphate d'une molécule d'ATP est transféré vers des histidines kinases (KinA, KinB, KinC, KinD et KinE). Ces kinases phosphorylées vont permettre un enchaînement de phosphorylations en cascade en commençant par la Spo0F devenant Spo0F-P, puis Spo0F-P permet la phosphorylation de Spo0B, devenant Spo0B-P, qui lui-même va phosphoryler Spo0A (Burkholder, Kurtser et al., 2001). L'augmentation en protéines Spo0A et leurs phosphorylations simultanées permet la synthèse d'importantes quantités de Spo0A-P jouant un rôle de régulateur dans l'expression des gènes nécessaires à la sporulation (Tojo, Hirooka et al., 2013).

1.1.2.2. Formation de la spore bactérienne

La sporulation est un processus dépendant des conditions environnementales pouvant prendre plusieurs heures. Par exemple, il a été démontré que la sporulation de *Bacillus subtilis* se fait en 7 heures à 37°C (Piggot and Hilbert, 2004). Ce processus de formation de la spore mature se fait en 7 étapes comme illustré par la Figure 3.

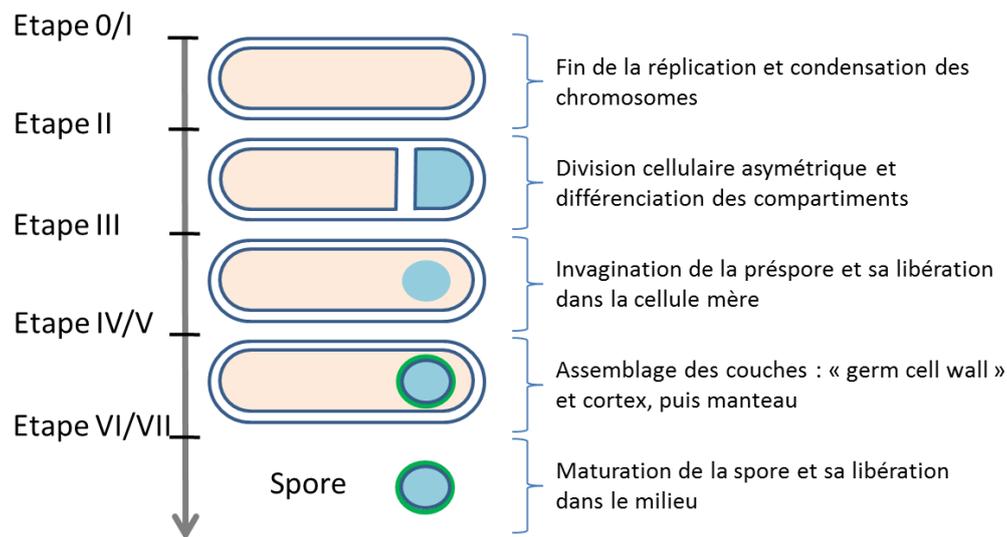


Figure 3 Les différentes étapes de la sporulation (McDonnell and Russell, 1999, Driks, 2002)

L'étape 0 indique le moment où la bactérie est encore sous forme végétative mais va pouvoir amorcer la première phase de la sporulation. La bactérie se trouve à la fin de la phase de réplication et contient alors deux chromosomes libres (Hilbert and Piggot, 2004).

L'étape I est une phase dite de pré-sporulation. Les chromosomes se condensent et s'allongent pour former un filament axial de chromatine. Ce filament se place sur l'axe longitudinal de la bactérie (Bylund, Haines et al., 1993, Errington, 2003). La bactérie entame alors une division cellulaire asymétrique contrôlée par Spo0A et σ^H marquant le début de l'étape II.

L'étape II représente la division asymétrique de la cellule en deux compartiments de taille différente, séparés par un septum. Le plus petit compartiment appelé la pré-spore, deviendra la spore lors de la maturation (Piggot and Coote, 1976, Errington, 2003). Le plus grand est nommé « cellule mère » et sera lysé à la fin de la sporulation. La différenciation de chaque compartiment se fait grâce à l'activation des gènes *spoIIG* et *spoIIA* par l'accumulation de la Spo0A-P. Ces gènes une fois activés permettent le codage de deux facteurs sigma, σ^F

dans la pré-spore et σ^E dans la cellule mère. Ils deviennent actifs seulement à la fin de la formation du septum. A cette étape du processus la répartition en matériel génétique est de 70% dans la cellule mère et 30% dans la pré-spore. Cependant, très rapidement la répartition se fera de façon plus équitable grâce à l'ADN translocase SpoIIIE qui va pomper le matériel génétique manquant de la pré-spore dans la cellule mère (*Bath, Wu et al., 2000, Molle, Fujita et al., 2003*).

L'étape III est définie comme l'invagination de la pré-spore par la cellule mère. La membrane de la pré-spore et celle de la cellule mère fusionnent au niveau d'un des pôles. Cette étape permet à la pré-spore de s'entourer d'une membrane interne et externe. La pré-spore forme alors une cellule à part entière qui flotte librement dans la cellule mère. La sporulation devient alors irréversible (*Hilbert and Piggot, 2004*).

L'étape IV représente la synthèse de deux couches de peptidoglycane, la paroi cellulaire germinative et le cortex, formées entre la membrane interne et externe. Cet assemblage de couches est contrôlé par l'activation des facteurs σ^E et σ^K (*Driks, 2002*).

L'étape V est l'étape de formation du manteau de la future spore (*Watabe, Iida et al. 1980*). Durant cette étape et l'étape précédente la cellule mère synthétise une importante quantité d'acide dipicolinique (DPA). Son accumulation accompagnée d'une réduction de la quantité d'eau dans la pré-spore permet son passage et celui de cations dont Ca^{2+} dans la pré-spore (*Leggett, McDonnell et al., 2012*). La formation de cette couche est possible par la présence de la protéine SpoIVA sur la membrane externe de la pré-spore. Enfin, la protéine CotE joue un rôle majeur dans l'assemblage du manteau. Durant cette étape certaines pré-spores vont acquérir leur exosporium dont la synthèse est conditionnée par l'activation de deux facteurs sigma, σ^K et σ^E .

L'étape VI représente la phase de maturation où la pré-spore acquiert une grande partie de ses compétences de résistance, dormance et de germination. Le manteau se densifie et sa réfringence augmente (*Russell, 1990*).

L'étape VII marque la libération dans l'environnement par la lyse de la cellule mère de la spore mature. Elle va pouvoir survivre dans cet état de dormance jusqu'à l'amélioration des conditions environnementales.

1.1.3. Etapes et mécanismes de la germination

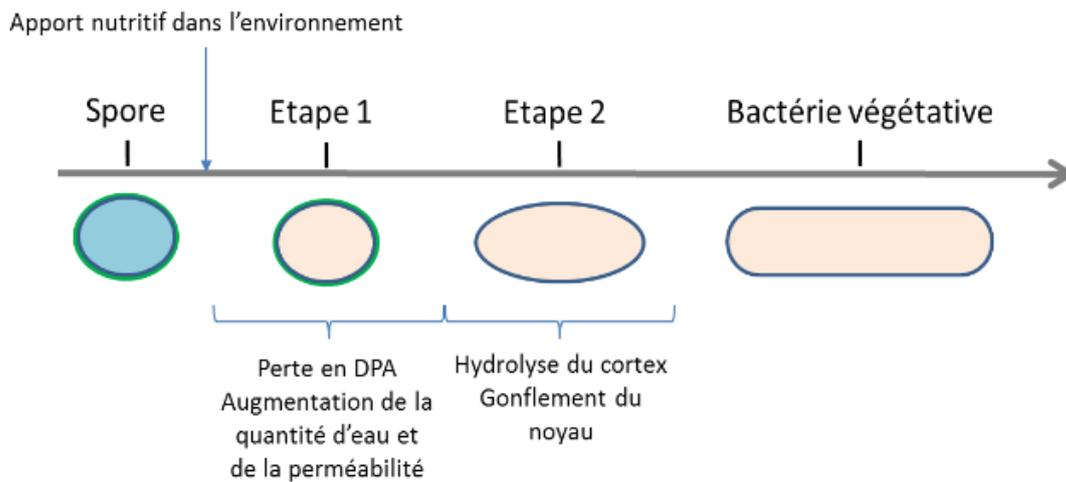


Figure 4 Les différentes étapes de la germination d'une spore bactérienne (Nguyen Thi Minh, Dantigny et al., 2010)

La bactérie sous forme sporulée peut vivre très longtemps dans cet état de dormance avant que les conditions environnementales lui redeviennent favorables. Elle va alors pouvoir retourner dans sa forme végétative et pouvoir se reproduire grâce au processus de germination (Figure 4). Ce processus rapide et irréversible se fait complètement en 30 à 60 minutes. Il nécessite des récepteurs et des protéines spécifiques à la spore pouvant être neutralisés par certains produits chimiques. D'autres produits empêchent la nouvelle cellule végétative de se reproduire après sa germination (Russell, 1990). Les désinfectants choisis pour notre étude ont un impact sur la germination des spores traitées (voir partie 1.3.1.).

1.1.3.1. Activation

L'activation de la germination se fait en réponse à un apport en nutriments dans l'environnement. C'est la seule étape réversible du processus de germination. Elle se fait par des molécules appelées germinatifs qui peuvent être des glucides ou des acides aminés (Setlow, 2003). Le passage de ces molécules se fait par changements membranaires et activations enzymatiques. Ces agents germinatifs se complexent avec des récepteurs de la germination (RG) situés sur la membrane interne (Setlow, 2014). Ces récepteurs sont associés à des protéines spécifiques, les protéines GerP. Ces protéines assurent le changement rapide de la perméabilité de la membrane interne et marquent l'entrée irréversible de la spore dans son processus de germination (Moir, 2006, Setlow, 2013).

En laboratoire, la germination peut être induite par d'autres facteurs que l'apport de nutriments. Ces facteurs sont par exemple, l'apport d'une grande quantité du complexe DPA- Ca^{2+} et des surfactants cationiques comme la dodécylamine, ainsi que l'utilisation d'une haute pression. Les tensioactifs utilisés dans nos mousses n'auront pas d'impact sur la germination car ce seront des surfactants anioniques. Même si la germination dans l'environnement est impossible par cette technique, elle suscite un intérêt pour la recherche dans le domaine agroalimentaire où elle peut être couplée avec des températures élevées pour la décontamination (Reineke, Mathys et al., 2013). Dans certains cas la germination peut aussi être induite par des chocs thermiques.

1.1.3.2. La germination

La germination se déroule en deux étapes. La première débute quelques minutes après la fixation des agents germinatifs sur les récepteurs de la germination (glucides ou acides aminés sur RG) (Kong, Zhang et al., 2011). Cela se traduit par une libération massive de cations dont H^+ , K^+ et Na^+ , ainsi que par la libération totale du complexe DPA- Ca^{2+} de la spore entraînant une modification de son pH (Swerdlow, Setlow et al., 1981, van Beilen and Brul, 2013). Cette libération se fait très rapidement par des canaux SpoVA spécifiques de la spore (Setlow, 2013). La modification de la membrane interne permettant cette libération entraîne une augmentation de sa fluidité ainsi que de sa perméabilité. La perte en DPA permet son remplacement par une importante quantité d'eau et le déclenchement de la deuxième phase de la germination.

La deuxième étape de la germination est la lyse du cortex par des enzymes lytiques du cortex (CLEs) telles que CwlJ et SleB (Heffron, Lambert et al., 2010). Ces enzymes reconnaissent spécifiquement la paroi de peptidoglycanes. Grâce à cette hydrolyse la pression sur le noyau de la spore diminue. Le noyau va alors se dilater et accumuler l'eau pour atteindre environ 80% du poids humide en eau de la bactérie (Paidhungat, Setlow et al., 2002). La surface de la membrane interne augmente aussi de taille en se multipliant presque par deux (Cowan, Olivastro et al., 2004) alors que le manteau et l'exosporium sont dégradés par protéolyse (Plomp, McCaffery et al., 2007).

A la fin de cette étape de germination vient ensuite une étape de développement. Les SASP sont hydrolysées permettant la production des protéines grâce aux produits de

dégradation. Le métabolisme est relancé avec la synthèse de molécules telles que les ARN et un peu plus tardivement de l'ADN, ainsi qu'une activité enzymatique forte dans le noyau (Moir, 2006).

La fin de la germination et du développement de la bactérie se conclut quand la bactérie s'allonge et s'extirpe de ces multicouches l'entourant quand elle était sous forme de spore (Steichen, Kearney et al., 2007). Elle va pouvoir alors entamer un processus de reproduction.

1.1.4. Les spores bactériennes dans notre environnement et leurs impacts

Même si leur utilisation peut avoir un impact positif dans notre vie courante comme l'utilisation de *Bacillus thuringiensis* (Bt) comme insecticide (Ibrahim, Griko et al., 2010), les spores peuvent être impliquées dans des crises sanitaires publiques et peuvent également être utilisées comme armes biologiques, contre lesquelles il convient de se prémunir.

Dans l'industrie agroalimentaire les spores sont responsables de toxi-infections graves. Certaines spores survivent aux températures de stérilisation des aliments et s'y développent durant leur conservation (Sugiyama, 1951). Par exemple, suite à un défaut de stérilisation les spores de *Clostridium botulinum* peuvent contaminer des produits finis et produire durant leur conservation la toxine botulique à l'origine de graves infections (King, Popoff et al., 2010).

Les spores peuvent survivre dans différentes matrices de l'environnement telles que le sol et l'eau. Certaines études ont même démontré que les spores peuvent persister plusieurs milliers d'années dans des sédiments marins (Postgate, 1990). Elles présentent des risques de pathogénie lorsqu'elles se retrouvent dans des milieux favorables tels que les poumons, les intestins ou même les plaies. Elles vont ainsi repasser sous forme végétative et se multiplier jusqu'à la possible mort de l'hôte. Dans le milieu hospitalier, les spores de *Clostridium difficile* sont la cause de diarrhées contractées par le patient durant son hospitalisation (Wilcox and Fawley, 2000). De même, il a été démontré que des spores de *Bacillus cereus* contaminent l'environnement hospitalier dont les équipements de ventilation et de filtration de l'air (Bottone, 2010). Les spores bactériennes peuvent aussi être sources de crises sanitaires dans le milieu vétérinaire. Les spores de *Bacillus anthracis* survivant dans l'eau et le sol contaminent le bétail provoquant leur mort (Turnbull, 2002). Cette infection n'est pas dangereuse pour l'homme si elle reste localisée au niveau de la peau mais de rares cas

d'infections accidentelles plus sévères sont survenus par ingestion d'animaux contaminés ou par inhalation dans les sites contaminés. Par exemple, l'inhalation du charbon en tant que risque industriel a entraîné l'adoption de la loi sur la prévention du charbon en 1919 en Angleterre. Au Zimbabwe, la guerre civile de 1979-1980 a poussé les personnes à manipuler et manger des animaux contaminés par le Charbon par manque de nourriture (Goel, 2015).

Leur grand pouvoir pathogène sur l'homme en cas d'inhalation et leur haute résistance aux conditions environnementales hostiles font des spores de *Bacillus anthracis* une potentielle arme biologique. Ces spores ont déjà été utilisées lors d'attentats terroristes. Par exemple, en 2001 aux Etats-Unis où des lettres contenant ces spores ont causé la mort de cinq personnes et environ 300 millions de dollars de coût en décontamination (Schmitt and Zacchia, 2012). L'un des meilleurs exemples de persistance dans l'environnement de ces pathogènes est la contamination en 1948 de l'île de Gruinard en Ecosse suite à des essais militaires. Des moutons ont été exposés à des spores de *Bacillus anthracis* provoquant la maladie du Charbon. Des échantillons de sol répartis sur une trentaine d'années ont démontré la persistance de la virulence des spores jusqu'à la décontamination de l'île en 1979 qui a été réalisée sur deux mois par la vaporisation sur le sol de formaldéhyde à 5% dilué avec de l'eau de mer (Kennedy, Reader et al., 1994).

1.1.5. Outils de résistance des spores bactériennes à la décontamination

Les bactéries sporulent afin de gagner en résistance suite aux conditions défavorables de l'environnement. Un grand nombre d'études a permis de déterminer quels sont les facteurs de résistance des spores comme le montre le Tableau 1 ci-dessous.

Type d'agent désinfectant	Facteur de protection
Radiation UV	Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Réparation de l'ADN ; Faible quantité d'eau dans le core
Radiation-γ	Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Réparation de l'ADN
Haute pression	Présence DPA ; Conditions de sporulation comme la température
Plasma	Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Manteau de la spore ; Réparation de l'ADN
Sécheresse	Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Présence DPA
Chaleur sèche	Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Réparation de l'ADN ; Présence DPA
Chaleur humide	Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Faible quantité d'eau dans le core ; Présence DPA ; Conditions de sporulation comme la température
Produits chimiques génotoxiques	Faible perméabilité de la membrane interne de la spore ; Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Réparation de l'ADN ; Faible quantité d'eau dans le core
Agents oxydants (OCl⁻, ClO₂, O₃)	Manteau de la spore ; Faible perméabilité de la membrane interne de la spore ; Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Présence d'enzymes détoxifiantes au manteau
Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	Saturation de l'ADN par les SASP α/β -type ; Faible quantité d'eau dans le core
Dialdéhydes	Manteau de la spore
Bactériovores	Manteau de la spore

Tableau 1. Mécanismes de survie de la spore face aux traitements physiques et chimiques (Nicholson, Munakata et al., 2000, Tennen, Setlow et al., 2000, Melly, Cowan et al., 2002, Young and Setlow, 2003, Young and Setlow, 2004, Setlow, Atluri et al., 2006, Setlow, 2006, Setlow, 2007, Reineke, Mathys et al., 2013)

Ce tableau permet de mettre en évidence les principaux facteurs morphologiques et physiologiques à l'origine de la résistance des spores aux traitements chimiques et physiques. Ce tableau met en évidence que les mécanismes de résistance de la spore ne sont pas les mêmes pour le peroxyde d'hydrogène et l'hypochlorite de sodium. Leurs comportements sur les spores sont donc différents (voir 1.3.1.).

1.1.5.1. Les parois de la spore comme barrière de résistance

La structure de la spore en multicouche contribue fortement à sa résistance. Le manteau est la paroi jouant le rôle le plus important dans cette résistance. Sa fonction est de servir de barrière initiale aux enzymes lytiques comme les lysozymes ou celles provenant des eucaryotes prédateurs (*Klobutcher, Ragkousi et al., 2006, Laaberki and Dworkin, 2008*). De plus, le manteau protège contre les perturbations mécaniques. Malgré l'imperméabilité du manteau pour les grandes molécules, des molécules plus petites comme celles nécessaires à la germination de la spore passent à travers cette barrière (*Driks, 1999*). Cependant, plusieurs études ont démontré qu'en l'absence de manteau, les spores deviennent aussi sensibles à ces produits que sous leurs formes végétatives. Cette absence peut être induite par la délétion d'un gène codant pour des protéines cruciales dans l'assemblage du manteau comme le gène *cotE* (*Setlow and Young, 2003, Ghosh, Setlow et al., 2008*). Le manteau permet ainsi la protection des couches intérieures de la spore face à certains produits chimiques et particulièrement les agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, le peroxyde d'azote, le dioxyde de chlore et l'hypochlorite de sodium (*Riesenman and Nicholson, 2000, Young and Setlow, 2004*). Seule la laccase CotA efficace contre le peroxyde d'hydrogène a été mise en évidence dans ce rôle de protection (*Henriques and Moran, 2007*). Des études ont décrit la détoxification par le manteau des agents chimiques avant leur pénétration dans les couches internes (*Riesenman and Nicholson, 2000, Setlow, 2006*).

D'autres couches de la spore présentent aussi des facteurs de résistance mais plus ciblés ou plus difficiles à définir. Par exemple, l'exosporium serait impliqué dans la restriction d'accès des antibiotiques au manteau (*Henriques and Moran, 2007, Joshi, Phillips et al., 2012*). Cependant, il ne semble pas jouer de rôle dans la résistance de la spore aux désinfectants. Celui de la membrane externe est difficile à définir car cette couche est indissociable techniquement du manteau. Il n'existe pas de mutant spécialement affecté au niveau de cette membrane car le fait de retirer le manteau chimiquement par des lysosymes entraîne la perte

de la membrane externe (*Buchanan and Neyman, 1986*). Même si la membrane externe est essentielle dans la formation de la spore, elle ne semble pas avoir de rôle connu dans la résistance de la spore aux radiations, à la chaleur et aux produits chimiques (*Nicholson, Munakata et al., 2000, Setlow, McGinnis et al., 2000*). Le cortex cependant participe à la résistance de la spore contre la chaleur humide par sa contribution à la réduction de la quantité d'eau dans le core. Des études ont mis en évidence que la modification du peptidoglycane du cortex est associée à un changement de la quantité d'eau au sein de la spore (*Sunde, Setlow et al., 2009*). Enfin, la membrane interne en étant imperméable confère à la spore une résistance contre les agents chimiques hydrophiles, en particulier ceux ciblant l'ADN (*Cortezzo and Setlow, 2005*).

1.1.5.2. Faible hydratation, faible perméabilité et composition minérale du core

L'un des facteurs de résistance de la spore est sa faible teneur en eau. Plusieurs études ont montré que la quantité en eau dans le core de la spore joue un rôle primordial dans la résistance de celle-ci aux températures. En effet, moins les spores de *Bacillus* contiennent de l'eau dans leur core, plus elles sont résistantes à la chaleur (*Nicholson, Munakata et al., 2000, Setlow, 2006*). Il apparaît aussi que les spores contenant moins d'eau survivent plus longtemps à basses températures (*Setlow, 1992*). Cette faible teneur en eau contribue à la protection de l'ADN permettant de diminuer le taux de dépurination et d'empêcher le clivage de l'ADN. Une diminution de l'hydratation de l'ADN permet aussi de diminuer l'impact des UV sur celui-ci (*Moeller, Setlow et al., 2009*). De même, la réduction de la quantité d'eau libre dans le core permet une meilleure interaction entre l'ADN et les protéines SASPs (*Setlow, 2014*). Enfin, il semble que la teneur en eau dans le core influence la résistance de la spore au peroxyde d'hydrogène ainsi qu'à la chaleur (*Paredes-Sabja, Raju et al., 2008*). Cette faible quantité en eau dans le core est maintenue par une faible perméabilité de la membrane interne. Celle-ci permet aussi de faire barrière à la pénétration dans le core de molécules hydrophiles dont certains agents chimiques ciblant particulièrement l'ADN (*Cortezzo and Setlow, 2005*). La composition en minéraux dans le core contribue à la résistance de la spore face à un traitement par chaleur humide (*Nicholson, Munakata et al., 2000*). Cette forte minéralisation du core de la spore est liée à sa faible quantité d'eau. En effet, l'eau expulsée durant la sporulation est remplacée par des minéraux tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ et Na^+ et le DPA (*Mah, Kang et al., 2008*).

1.1.5.3. Le rôle protecteur de l'acide dipicolinique (DPA)

Le DPA permet l'établissement et le maintien de la déshydratation du core, contribuant ainsi à la protection de la spore à la chaleur et au peroxyde d'hydrogène (*Paidhungat, Setlow et al., 2000, Setlow, Atluri et al., 2006*). Cette molécule très abondante dans le core se chélate avec les cations et préférentiellement le Ca^{2+} pour former un complexe. Ce complexe joue un rôle dans la protection de l'ADN en diminuant la photo-réactivité de l'ADN de la spore et la nature de photoproduits générés (*Douki, Setlow et al., 2005*). L'étude de *Setlow and Setlow* en 1995, a montré que la DPA prenait le relais en terme de protection de l'ADN, quand celle fournie par les molécules de SASP de type α et β n'est plus opérationnelle (*Setlow and Setlow, 1995*).

1.1.5.4. Protection de l'ADN par les protéines SASP et son système de réparation

L'ADN est saturé par une protéine appelée « Small Acid-soluble Spore Protein » (SASP) type α - β qui contribue grandement à sa protection contre les agents chimiques, la dessiccation et les UV. Cette protéine se trouvant exclusivement dans la spore, est produite seulement durant le processus de sporulation (*Setlow and Setlow, 1995*). Elle se fixe directement sur l'ADN, de préférence à l'extérieur de l'hélice type B, permettant à celle-ci de se raidir et de modifier sa configuration pour passer sous forme d'hélice de type A (*Nicholson, Munakata et al., 2000*). Dans une cellule végétative les UV génèrent des photo-produits au niveau de l'ADN extrêmement mutagènes et létaux pour la bactérie. Les photo-produits générés sont différents sur l'ADN de la spore saturé en SASP. Ils sont appelés « photo-produits de spore » (SP) et sont très bien pris en charge par des enzymes permettant la réparation de l'ADN (*Moeller, Raguse et al., 2014*). L'utilisation de spores mutées sur les gènes produisant la SASP, a permis de montrer une très forte sensibilité de celles-ci aux UV. Leur ADN n'étant pas saturé en SASP, les spores sont neutralisées par des photo-produits différents des SP (*Setlow, 2001*). D'autres études avec ces mêmes mutations, ont permis de déterminer que les SASP contribuent à la protection de la spore face à certains agents chimiques génotoxiques comme le peroxyde d'hydrogène et face aux dépurinations par chaleur humide et sèche (*Setlow, 1992, Setlow, McGinnis et al., 2000, Leyva-Illades, Setlow et al., 2007*).

En plus des SASP, un système de réparation de l'ADN se met en place très rapidement quand la spore va sortir de son état de dormance où elle a accumulé les mutations. Les deux

premiers processus de réparation sont la recombinaison et l'excision. Ces systèmes de réparation suivent le même fonctionnement que dans la cellule végétative. Cependant leur activation est dépendante du gène *recA* et de protéines spécifiques à la spore (Moeller, Setlow et al., 2008). Le troisième processus est l'utilisation d'enzymes, photo-produits, de type lyases propres aux spores et n'agissant que sur des SP (Salas-Pacheco, Setlow et al., 2005).

1.1.5.5. Acquisition des résistances durant la sporulation

La spore acquière durant sa sporulation l'ensemble des moyens de lutte contre les traitements physiques et chimiques. L'obtention des outils de résistance de la spore se fait de l'étape III à la fin d'étape VI, c'est-à-dire de la sporulation jusqu'à peu avant la libération de la spore par la cellule mère (Shaker, Furr et al., 1988). Un ensemble d'études a permis de déterminer les étapes durant lesquelles la spore développe sa résistance à certains produits chimiques et traitements physiques (Knott, Russell et al., 1995). Ces études sont souvent basées sur l'utilisation de spores mutées appelées « spo⁻ » bloquées à une étape choisie de la sporulation. Par exemple, le mutant Spoll est bloqué lors de l'étape II où son septum se forme correctement mais l'invagination n'est pas complète (Power, Dancer et al., 1988). L'utilisation de mutants spo⁻ de *Bacillus subtilis* (Shaker, Dancer et al., 1988) a permis de démontrer que la spore devient résistante en premier au toluène à la fin de l'étape d'invagination (III) puis à la chlorhexidine (V). Elle acquière ensuite sa résistance à la chaleur et aux lysozymes en étape VI ainsi qu'aux glutaraldéhydes avant la libération de la spore. Il a été démontré que la résistance au méthanol, à l'éthanol et aux autres alcools se fait au même moment durant l'étape IV. Le développement de la résistance au formaldéhyde et au glutaraldéhyde ne se fait pas aux mêmes étapes de la sporulation. La résistance au formaldéhyde peut être liée à la maturation du cortex en étape IV alors que celle au glutaraldéhyde à celle de la maturation du manteau en étape VI (Power, Dancer et al., 1988). La résistance à la chaleur et aux UV se fait juste après la fin de l'étape V grâce à la diminution de la teneur en eau et l'accumulation de cations et de DPA dans la pré-spore (Nicholson, Munakata et al., 2000). La résistance au peroxyde d'hydrogène et à l'hypochlorite de sodium se fait en fin d'étape V où la synthèse de SASP est activée par le facteur σ^G seulement dans la pré-spore libre dans la cellule mère (Sabli, Setlow et al., 1996).

1.1.5.6. Différences de résistance suivant le terrain génétique et les conditions de sporulation

Même si les bactéries en sporulant acquièrent l'ensemble des outils morphologiques et physiologiques détaillés ci-dessus, toutes ne résistent pas de la même façon. En effet, deux autres facteurs de résistances rentrent aussi en jeu : les conditions de sporulation et de prétraitement, ainsi que le terrain génétique de la bactérie.

La résistance de la spore est différente suivant l'espèce et les conditions de vie dans l'environnement des bactéries. L'information génomique est importante pour déterminer les niveaux de résistance des spores chez les bactéries de type sauvage (sans mutation induite en laboratoire). Par exemple, des spores de bactéries thermophiles (vivant à 50-70°C) ont été classées comme plus résistantes à la chaleur humide que des spores de mésophiles (vivant à 20-40°C). De même, ces dernières sont considérées comme plus résistantes que les spores de bactéries psychrophiles (vivant en-dessous de 15°C) (*Gerhardt and Marquis, 1989*). Des études ont démontré que des bactéries subissant des mutations d'ADN peuvent avoir une altération considérable de leur résistance une fois sous forme de spore. Ainsi, la suppression de certains gènes codant pour la DPA ou la réparation de l'ADN entraînent la diminution de la résistance de la spore (*Paidhungat, Setlow et al., 2000, Young and Setlow, 2004*).

Les conditions de sporulation peuvent accentuer de façon positive ou négative la résistance de la spore à certains traitements. Des études ont permis d'identifier l'implication de la température, du pH et de la présence de certains minéraux dans la résistance à des traitements physiques et chimiques (*Malleck, Daufouy et al., 2018*). Par exemple, les spores de *Bacillus subtilis* formées à un pH de 10 sont plus résistantes à la chaleur que leurs homologues formées à pH 7. Si la sporulation se fait à 19°C, par contre elles perdent en partie cette résistance à la chaleur (*Nguyen Thi Minh, Durand et al., 2011*). A l'inverse une température de sporulation élevée va invariablement augmenter la résistance de la spore à la chaleur. Cet effet est dû en partie à la diminution de la quantité d'eau dans le core de la spore quand celle-ci est obtenue à plus haute température (*Nicholson, Munakata et al., 2000*). La modification des conditions de sporulation impacte donc la composition de la spore. L'absence d'ions Calcium dans le milieu de sporulation peut inhiber la formation du complexe DPA-Ca²⁺ (*Nguyen Thi Minh, Durand et al., 2011*). De même, l'hydrophobie de la spore dépend du milieu et des conditions dans lesquels elle réalise sa sporulation (*Wiencek, Klapes et al., 1990*). Dans notre étude, les productions de spores de *Bacillus thuringiensis* et de *Geobacillus*

stearothermophilus ont été réalisées en grande quantité afin que la majorité des essais soit réalisée sur une même production.

Enfin, les spores ayant déjà survécues à un traitement chimique ou physique peuvent avoir une sensibilité plus importante à toutes autres formes de décontamination ou devenir plus résistantes aux prochains stress. Par exemple, l'étude de *Cortezzo et al.* en 2004 a démontré que les spores prétraitées par un agent oxydant ont une sensibilité accrue à la chaleur alors que celles prétraitées par chaleur humide ne présentent pas cette augmentation de sensibilité (*Cortezzo, Koziol-Dube et al., 2004*). Il faut souligner ici la grande diversité de réponses des bactéries sporulées aux conditions environnementales naturelles ou imposées. En fait, il n'y a donc pas de règle mais des grands principes généraux.

1.2. Les biofilms bactériens

Un biofilm bactérien est défini comme un amas de bactéries enrobées dans une matrice protectrice d'exopolysaccharides, adhérant à une surface (*Donlan and Costerton, 2002, Garrett, Bhakoo et al., 2008*) (Figure 5). Cette phrase définit parfaitement toutes les notions primordiales d'un biofilm. En effet, un biofilm est caractérisé par sa composition, sa formation en amas, sa localisation sur une multitude de surfaces et sa protection permettant sa résistance face aux traitements de décontamination. Ce sont ces quatre notions qui seront détaillées dans ce chapitre.

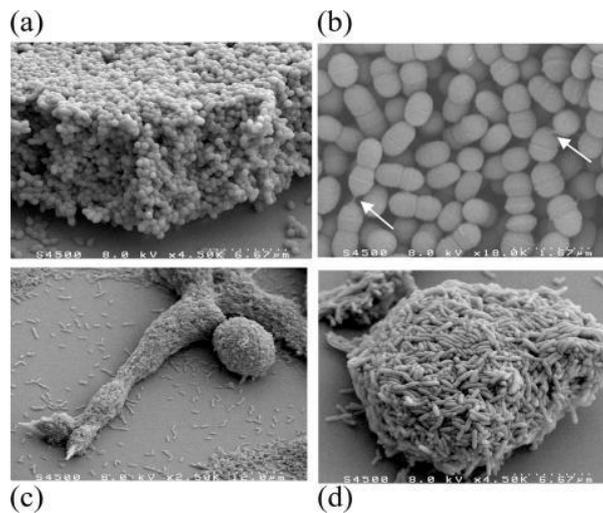


Figure 5. Images MEB de biofilms de *Lactococcus lactis* OSM31 (a et b) et *Stenotrophomonas maltophilia* (c et d) formés en 24h à 30°C dans une chambre à flux. Les flèches en image b indiquent l'exopolysaccharide entre les bactéries (*Briandet, Lacroix-Gueu et al., 2008*)

1.2.1. Une composition à la fois variée et structurée

1.2.1.1. Les bactéries au sein du biofilm

Un biofilm bactérien est constitué d'une seule ou de plusieurs espèces bactériennes sur une épaisseur pouvant atteindre plusieurs dizaines voire centaines de micromètres. Dans l'environnement il est plus courant de trouver des biofilms naturels avec différentes espèces bactériennes (*Madsen, Sorensen et al., 2018*). En plus des bactéries, les biofilms comportent une multitude d'autres micro-organismes tels que des protozoaires, des champignons, des micro-algues, des virus ainsi que des spores comme par exemple des biofilms contenant des spores de *Bacillus anthracis* (*Costerton, 1999, Dong, McCoy et al., 2014*). Les biofilms composés uniquement d'une espèce bactérienne sont des biofilms formés en laboratoire.

Une diversité physiologique est observable avec des strates de bactéries distinctes au sein du biofilm. La physiologie et donc le métabolisme d'une bactérie sont différents si la bactérie se situe en périphérie du biofilm ou en son centre. Les bactéries au sein du biofilm sont dans un état de dormance car elles ont un apport limité en nutriments (Folsom, Richards et al. 2010). En effet, leur position au cœur du biofilm ne leur permet pas de bénéficier d'un apport direct en composés nécessaires au maintien de leur métabolisme. Leur taux de croissance et leur métabolisme restent donc faibles (Jouenne, 2008). De fait, les bactéries en périphérie se multiplient et permettent l'augmentation de la taille du biofilm. Leur position sur la strate extérieure leur facilite l'apport direct en nutriments et composants nécessaires à leur croissance dont l'oxygène.

La multiplication cellulaire est sous contrôle du « quorum sensing ». Le « quorum sensing » est le système de communication entre bactéries. Cette communication bactérienne se fait grâce à des phéromones ou peptides (Davies, Parsek et al., 1998). La bactérie est alors capable de quantifier les autres micro-organismes qui l'entourent. Quand la quantité dans l'environnement des molécules de quorum sensing atteint un seuil critique des gènes spécifiques sont activés (Pesci and Iglewski, 1997). De façon générale, la bactérie au sein d'un biofilm n'a pas la même physiologie qu'en suspension (Folsom, Richards et al., 2010). L'expression de certains gènes ne se fait que lorsque la bactérie est intégrée à la communauté du biofilm. Ainsi, des gènes permettant la production de protéines de surface nécessaires dans les transports entre les cellules et l'environnement sont activés. De même, la synthèse de phéromones spécifiques permet la structuration du biofilm (Briandet, 2012).

Cette communication par « quorum sensing » permet également aux bactéries d'interagir entre elles de façon collaborative ou compétitive (De Kievit, Gillis et al., 2001). La quantité très importante en bactéries dans un biofilm mature contribue à l'installation d'une compétition entre elles pour une ressource comme les nutriments ou l'espace. Par exemple, afin d'occuper les strates supérieures riches en composés certaines bactéries vont augmenter leur sécrétion de matrice. Ainsi, elles occupent plus d'espace en surface et diminuent l'apport en nutriments des couches plus profondes. De plus, certaines vont jusqu'à produire des molécules toxiques (H₂O₂) appelées bactériocines, provoquant la lyse des bactéries voisines (Valdebenito, Tullume-Vergara et al., 2018). Cependant, le bien de la communauté prévaut en général sur les comportements égoïstes afin d'assurer la survie du plus grand nombre. Ainsi,

des interactions communes sont mises en place pour la collaboration entre les bactéries (Madsen, Sorensen et al., 2018). Les bactéries peuvent coopérer en créant des chaînes métaboliques où chacune d'elle a un rôle précis. Par exemple, des bactéries de type méthanogène coopèrent avec des bactéries acétogènes afin d'assurer une chaîne de transformation de la matière organique en biogaz. Les bactéries sont aussi capables de produire au même moment un composé nécessaire pour toute la communauté. C'est le cas par exemple avec la synthèse d'enzymes dégradant des nutriments, de surfactants ou d'éléments de la matrice structurale (Ren, Madsen et al., 2015, Roder, Raghupathi et al., 2015). Certaines bactéries ne possédant pas de récepteurs de surface aux molécules du « quorum sensing », ne participent pas à ce travail collectif. Afin de se développer plus vite ces bactéries profitent alors de la demande coûteuse en énergie des autres bactéries pour produire ces molécules.

1.2.1.2. L'exopolysaccharide (EPS)

Les bactéries sont capables de s'assembler et former des structures tridimensionnelles grâce à la production d'une matrice appelée l'exopolysaccharide ou EPS. La composition de cette matrice diverge suivant l'espèce bactérienne et les conditions environnementales. Elle est majoritairement constituée d'eau (jusqu'à 97% pour certaines espèces) et peut contenir des polysaccharides (homo ou hétéropolysaccharides), des protéines, des lipides, des acides nucléiques, des tensioactifs, des glycolipides et des cations (Flemming and Wingender, 2010). Certains polysaccharides sont communs à plusieurs espèces bactériennes comme la polyglucosamine et la cellulose. L'ensemble confère une stabilité mécanique au biofilm. De plus, cette matrice contribue à l'adhésion du biofilm sur le support en plus de celle des bactéries, ainsi qu'à sa structuration interne et externe (Monk, Cook et al., 2004). Les bactéries au sein du biofilm sont en grande majorité maintenues immobiles par la matrice d'EPS, empêchant tout mouvement brownien (Costerton, 1999). Les liaisons entre molécules d'hydrogènes, les interactions électrostatiques entre les ions et les forces de dispersion dites de London, permettent le maintien de la structure par cette matrice (Flemming, Wingender et al., 1999).

1.2.1.3. Architecture d'un biofilm

L'ensemble des bactéries et de l'exopolysaccharide (EPS) forme l'architecture du biofilm. Leur présence au sein du biofilm est répartie suivant un ratio dépendant de l'espèce des bactéries. Ainsi, un biofilm est généralement composé de 10 à 25% de bactéries et de 75 à 90% de la matrice d'exopolysaccharides (Costerton, 1994). Leur répartition géographique dans le biofilm n'est pas homogène. Ainsi, la présence en EPS est plus dense au cœur du biofilm.

La structure d'un biofilm peut se faire suivant différentes architectures. Ces différences architecturales entre les biofilms dépendent de l'espèce bactérienne, des propriétés du support ainsi que des conditions environnementales plus ou moins favorables. La plus étudiée de ces architectures est la forme « champignon » qui est observée pour les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* par exemple. En moyenne une structure en « champignon » de *P. aeruginosa* atteint 30 µm de hauteur avant le décrochement d'une partie du biofilm (Ghanbari, Dehghany et al., 2016). A cause de l'accessibilité à l'oxygène, la plupart des bactéries vivantes sont dans la partie haute en forme de « chapeau », tandis que la partie « tige » est plus délaissée (Costerton, 1999). Cette structuration du biofilm est conditionnée par la production d'une phéromone, l'homosérine lactone (HSL) (Davies, Parsek et al., 1998). D'autres biofilms se forment de façon plus simple comme en tapis plat ou crénelé de plusieurs couches. De même, il est possible de voir des biofilms sous forme d'algue ou de ruban. Cependant, quand la quantité de certaines hormones (« quorum ») devient importante dans le milieu, les bactéries vont pouvoir adopter une forme différente. De plus, une même espèce ne va pas forcément adopter la même structure architecturale de biofilm suivant leur souche. Ainsi, des biofilms de certaines souches de *P. aeruginosa* vont plutôt se développer sous forme de tapis que sous forme de « champignon » (Parsek and Tolker-Nielsen, 2008). La structure du biofilm peut être renforcée par le maillage d'appendices extérieurs aux bactéries comme les flagelles ou pili et par l'excrétion de fibres protéiques (Van Houdt and Michiels, 2010). La distribution architecturale d'un biofilm dépend aussi des conditions extérieures auxquelles il est soumis. Ainsi, les forces abrasives et hydrauliques du milieu vont avoir un impact sur la structure extérieure du biofilm. De même, suite à une attaque du biofilm par des amibes ou des protozoaires, son développement en structure « champignon » sera favorisé, le rendant plus résistant (Rasamiravaka, Labtani et al., 2015).

L'organisation d'un biofilm se fait également de façon interne. L'intérieur d'un biofilm est organisé pour permettre la survie de toutes les bactéries de la communauté. Ainsi, afin d'apporter un peu de nutriments et d'oxygène aux bactéries dans les strates les plus profondes, des canaux sont mis en place rendant le biofilm plus poreux (*de Beer, Stoodley et al., 1994*). Ces canaux sont créés et entretenus par des sous-populations de bactéries toujours équipées de leur flagelle. Ces bactéries mobiles, seules ou en groupe, sont capables de s'infiltrer dans la masse et de « vasculariser » les couches de cellules grâce à leur poids et leur vitesse. D'autres bactéries se disposent en chaînette les unes derrière les autres et entament un mouvement circulaire telle une « perceuse ». Par cette méthode de perforation, il a déjà été observé la formation de canaux de 10 µm de diamètre. De plus, la répartition en gradient des bactéries crée des zones physiologiques différentes au sein du biofilm. Des micro-habitats se forment avec des conditions adaptées à l'activité et l'espèce des bactéries en présence (*Sauer, Camper et al., 2002, Flemming and Wingender, 2010*). Ainsi, le pH, le taux d'oxygène, la quantité en nutriments, la production métabolique et même la morphologie des bactéries peuvent être différents d'un micro-habitat à un autre (*Brown and Gilbert, 1993*). Par exemple, les biofilms se développant dans la cavité buccale ont des zones en profondeur colonisées par des bactéries anaérobies strictes et des zones plus en surface avec des bactéries aérobies (*Marsh, 1994, Socransky, Haffajee et al., 1998*).

1.2.2. Une formation en plusieurs étapes

Afin d'augmenter leur survie dans l'environnement les bactéries suivent l'adage « l'union fait la force » en mutualisant leurs capacités métaboliques et leurs moyens de défense. Cette mutualisation est rendue possible par la formation d'un édifice structuré en quatre grandes étapes allant de la colonisation jusqu'à la dissémination comme illustré par la Figure 6.

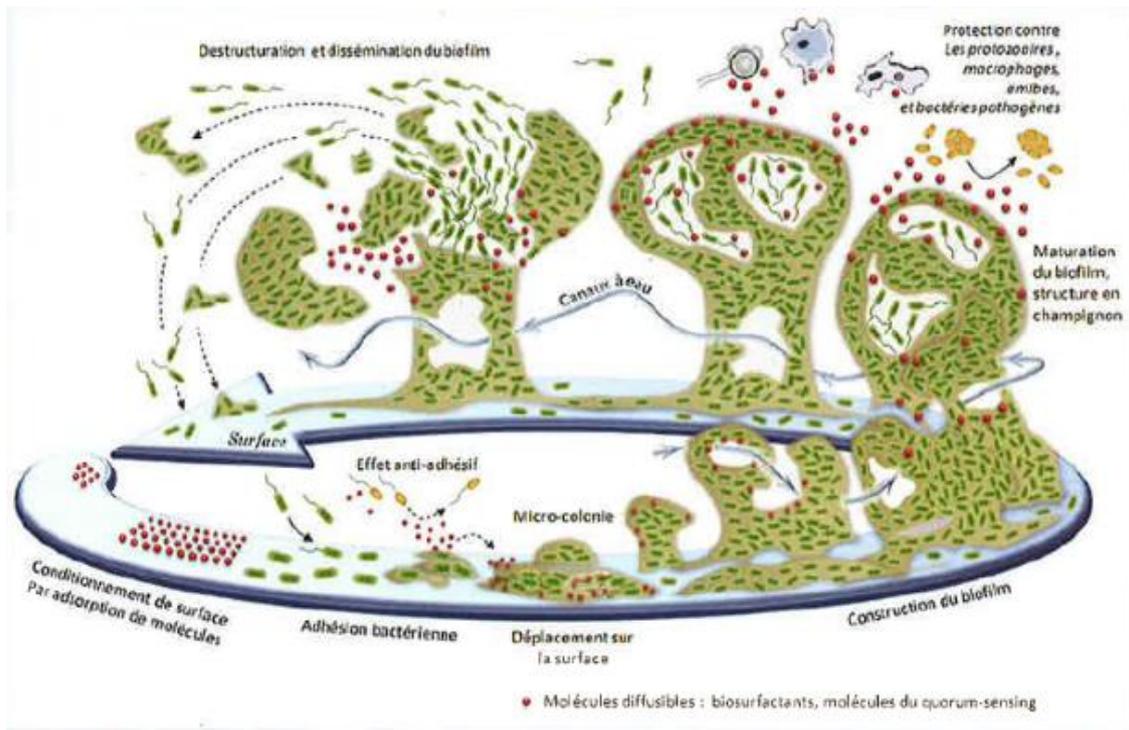


Figure 6. Schéma des étapes de la formation du biofilm, de l'adhésion à la dissémination des bactéries, par T. Meylheuc (*Briandet, 2012*)

1.2.2.1. Colonisation de la surface par les bactéries :

Avant de former un biofilm, les bactéries doivent rejoindre une surface propice à leur adhésion appelé substratum. Afin de rejoindre cette surface idéale les bactéries vont utiliser différents moyens pour se déplacer.

Les bactéries de type planctonique viennent généralement de l'érosion ou du détachement d'une partie d'un autre biofilm voisin. Dans un liquide, les bactéries en suspension sont soumises à la gravité, l'agitation brownienne ou l'hydrodynamique des fluides qui leur permettent de rentrer en contact avec une surface ou remonter à l'interface air-liquide.

D'autres bactéries sont capables de provoquer elles-mêmes leurs déplacements dans un liquide grâce à des flagelles (*Van Houdt and Michiels, 2010*). Les flagelles (15 à 20 μm) sont des extensions protéiques qui permettent le déplacement des bactéries. La vitesse de migration d'une bactérie peut atteindre jusqu'à 150 $\mu\text{m/s}$ permettant à celle-ci de parcourir 50 cm par heure ce qui équivaut à 150 fois sa taille par seconde (*Briandet, 2012*).

Les bactéries peuvent aussi être transportées par les voies aériennes jusqu'au lieu de colonisation. Certaines sont capables de parcourir de très grandes distances grâce au vent ou même par les nuages. A l'inverse le transport des bactéries peut se faire suite au décrochement d'une partie du biofilm ou par un vecteur tel que des particules de poussière (*Marion, Freney et al., 2006*).

Une fois au niveau de la surface grâce à leur flagelle, les bactéries peuvent adhérer sur une surface si les conditions sont favorables (*Bouffartigues, Duchesne et al. 2014*) et se déplacer seules par « swimming » ou en groupe par « swarming » pour trouver l'endroit le plus propice (*Pratt and Kolter, 1998, Fraser and Hughes, 1999, Deziel, Comeau et al., 2001*). En plus de l'utilisation des flagelles, certaines bactéries se déplacent en rampant (« twitching ») sur la surface grâce à la rétractation de filaments protéiques contenant de l'adhésine à leur extrémité appelés pili de type IV (*O'Toole and Kolter, 1998*). Cependant, certaines bactéries ne disposant ni de flagelles ni de pili sont aussi capables de former des biofilms par glissement (« gliding ») (*McBride, 2001*).

Les surfaces colonisées peuvent être biologiques comme les muqueuses, ou inertes comme l'acier inoxydable d'appareils médicaux (*Lee, Bae et al., 2015*). Les propriétés physico-chimiques et la topographie de la surface influencent le choix de la zone de colonisation. Ainsi les bactéries hydrophiles vont plus facilement adhérer sur des surfaces hydrophiles que sur des surfaces hydrophobes et *vice versa* (*Grivet, Morrier et al., 2000, Bruzaud, Tarrade et al., 2015*). De plus, les traitements chimiques appliqués sur le support peuvent modifier significativement la tension superficielle de la surface, la rendant plus ou moins hydrophobe (*Boulangepetermann, Baroux et al., 1993*). La présence d'un film organique modifie partiellement ou totalement les propriétés physico-chimiques du support, augmentant ou diminuant l'adhésion des bactéries (*Baier, 1970*).

Au niveau topologique, les bactéries privilégient l'adhésion dans les zones d'anfractuosités, au niveau de rayures et autres irrégularités des surfaces. L'aire de colonisation est plus importante dans ces zones et les bactéries seront en partie protégées des agressions extérieures (*Renner and Weibel, 2011*).

1.2.2.2. L'adhésion

L'adhésion des bactéries sur le support ne nécessite pas une grande quantité de bactéries (une seule suffit) et se fait en deux étapes.

La première étape consiste en l'adhésion réversible des bactéries sur le support par des liens physiques. Cette adhésion se fait suivant les propriétés hydrophiles et la charge électrique du substrat, ainsi qu'en fonction des mouvements browniens et de la force d'attraction Van der Waals (interactions dipolaires non covalentes entre molécules) (*Faille, Jullien et al., 2002, McClaine and Ford, 2002, Soni, Balasubramanian et al., 2008*). Durant cette étape, les bactéries peuvent être facilement détachées du support par simple effet mécanique. Les bactéries ont alors encore la possibilité de retourner à l'état planctonique avant leur adhésion irréversible au support. Cette étape se fait cependant en quelques secondes.

La seconde étape est l'adhésion irréversible des bactéries sur la surface. La liaison Van der Waals entre le support et les bactéries se renforce par l'installation de liaisons hydrogènes (*Van Houdt and Michiels, 2010*). Leur interaction se fait maintenant aussi de façon chimique par la sécrétion de molécules appelées adhésines. Les molécules d'adhésines regroupent plusieurs protéines différentes participant à l'adhésion de la bactérie. Ces macromolécules proviennent généralement de la surface de la bactérie et de l'extrémité des pili. De multiples adhésines sont spécifiques à un support comme c'est le cas pour l'adhésion de bactéries sur des tissus cellulaires qui sont pourvus de récepteurs à ces protéines (*Rutter, Dazzo et al., 1984*). En plus de la sécrétion d'adhésines, les bactéries commencent à générer la matrice extracellulaire, un exopolymère constitué de plusieurs polysaccharides. Cette matrice ancre les bactéries sur la surface et joue un rôle primordial dans la structure du biofilm. Après cette étape d'adhésion irréversible et jusqu'à maturation du biofilm, le détachement des bactéries ne peut se faire qu'avec une action mécanique ou chimique forte (*An and Friedman, 1997*).

Cette étape est plus difficile à réaliser en laboratoire que dans l'environnement. En effet, les souches bactériennes utilisées en laboratoire ont plus de difficulté à adhérer sur les supports que leurs homologues sauvages dans l'environnement (*Costerton, 1999*).

1.2.2.3. La maturation

Le processus de maturation du biofilm est caractérisé par une augmentation du nombre de bactéries et une importante sécrétion d'exopolysaccharides.

Après une courte phase initiale de latence suite à l'adhésion, les bactéries se multiplient augmentant leur nombre. Les cellules nouvellement formées se déploient vers l'extérieur et vers le haut à partir du point d'ancrage sur le support (*Hall-Stoodley and Stoodley, 2002*). La multiplication exponentielle des bactéries est contrôlée par des facteurs physiques et chimiques dans l'environnement. La croissance rapide n'est possible que si la quantité en nutriments dans l'environnement est suffisante et si le support est stable.

Durant la maturation les bactéries passent d'un mode de vie planctonique à celui de vie en communauté. Leur morphologie et l'expression de leurs gènes vont donc être modifiées pour répondre aux besoins d'une vie communautaire. Ainsi chez les bactéries mobiles telles *Escherichia coli*, le flagelle disparaît au profit de l'excrétion de polysaccharides. De même, ce changement de phase permet l'expression de certains gènes comme ceux codant pour des protéines de surface. Par exemple, les bactéries produisent à leur surface les protéines OprC et OprE qui permettent les transports internes et externes de la cellule comme l'excrétion du polysaccharide (*Hancock, Siehnel et al., 1990*).

C'est durant cette étape que l'augmentation du nombre de bactéries et la forte production d'EPS, permettent au biofilm d'acquérir une forme tridimensionnelle.

1.2.2.4. Le détachement et la recolonisation

La dernière étape du développement d'un biofilm est le détachement passif ou actif de bactéries des couches supérieures, l'essaimage. Le but de ce processus est la reconquête de nouveaux espaces par les bactéries. Ce détachement peut être induit par divers facteurs comme la surpopulation, le manque de nutriments ou un changement environnemental (température, pH, taux d'oxygène) (*Gjermansen, Ragas et al., 2005*). Les bactéries peuvent être libérées en continu ou de façon ponctuelle, ainsi que de façon mécanique par arrachage ou par dégradation enzymatique. Les bactéries peuvent elles-mêmes produire des enzymes attaquant l'EPS permettant leur libération (*Kostakioti, Hadjifrangiskou et al., 2013*). La reconquête peut être réalisée par le détachement d'une partie du biofilm ou par l'essaimage de quelques bactéries. Lors d'essaimage, les bactéries recouvrent leur capacité à se déplacer.

Elles acquièrent de nouveau un flagelle et modifient leurs propriétés de surface. Si la dissémination se fait par l'arrachage d'un fragment de biofilm, les bactéries sont encore fixées les unes aux autres et l'EPS est encore présent. Ce fragment contenant les bactéries est déplacé sur plusieurs centaines de micromètres par glissement ou roulement sur la surface (*McBride, 2001*). Certaines vont même se laisser porter par les courants pour coloniser des zones plus lointaines (*Marion, Freney et al., 2006*).

Pour finir, la construction d'un nouveau biofilm peut se faire sur l'ancien si ce dernier a été en partie voire totalement détruit (*Fauvart, De Groot et al., 2011*). La destruction d'un biofilm peut être due à un manque de nutriment devenant trop important ou par agressions mécaniques ou chimiques. Les bactéries vont alors déconstruire l'édifice qui va s'effondrer et provoquer l'exode des bactéries vivantes restantes. Elles vont ainsi pouvoir reformer de nouvelles colonies ou attendre que les conditions redeviennent favorables pour reformer un biofilm sur les vestiges de l'ancien (*Karatan and Watnick, 2009*).

Grâce à leur capacité de migration et de régénération, les biofilms peuvent coloniser une multitude d'espace et une grande surface en un temps très court.

1.2.3. Les biofilms bactériens nous entourent et nous impactent

Les biofilms sont omniprésents dans notre environnement. Les éviers, les parois de la douche, les poignées de portes, les téléphones et même les brosses à dents sont de multiples surfaces colonisées par les biofilms. Il est considéré que la grande majorité des bactéries hors laboratoire, vivent sous forme de biofilm et que la période de vie planctonique d'une bactérie n'est que transitoire (*Dalton and March, 1998*). Leur présence est ambivalente suivant leur localisation car les biofilms peuvent avoir un aspect positif dans notre quotidien mais aussi être à l'origine de graves problèmes sanitaires et économiques.

Dans l'environnement aquatique, les biofilms sont nécessaires au bon fonctionnement du milieu naturel. Ils sont présents sur toutes les surfaces immergées ou à proximité de l'eau (*Hall-Stoodley, Costerton et al., 2004*). Que ce soit sur les graviers au fond d'une rivière, sur le sable ou sur les plantes attenantes au point d'eau, ils participent à l'écologie du milieu où ils poussent. Ils produisent la première source nutritive de la chaîne alimentaire de ces milieux en s'alliant en communautés hétérogènes de micro-organismes. En effet, les biofilms sont capables de produire de la matière organique à partir uniquement de matières minérales. En

plus, par ce processus de recyclage de la matière organique, ils contribuent à l'autoépuration des milieux aquatiques (Azimi, Hassani et al., 2017). Cependant, il n'est pas toujours bon de les voir s'installer sur les surfaces immergées. En effet, les biofilms colonisent les surfaces immergées par un processus de biosalissure appelé aussi « biofouling ». Les surfaces telles que les coques des navires, les filets de pêches, les gazoducs, les installations aquacoles ou les appareils de mesures, une fois immergées dans l'eau sont la cible de micro-organismes cherchant plus d'espace où s'installer. L'installation de biofilms sur ces surfaces induit des impacts économiques et écologiques. Par exemple, les biosalissures sur les coques des navires entraînent une surconsommation en carburant par l'alourdissement du bateau et l'augmentation de sa résistance aux déplacements. De plus, les bateaux charrient les micro-organismes contenus dans les biofilms autour du monde lors des déplacements, provoquant leur installation dans de nouveaux habitats où ils peuvent devenir nuisibles et invasifs. Enfin, les biofilms sur ces surfaces entraînent leur détérioration par corrosion.

Dans les environnements autres qu'aquatiques, les biofilms peuvent se former sur des surfaces non immergées comme les plantes ou le sol, et contribuent à leur protection. Sur le sol les biofilms de bactéries, cyanobactéries, lichens et mousses permettent la protection des sols à l'érosion. Sur les plantes, ils se fixent sur les parties en contact avec l'extérieur comme les feuilles et les tiges. Ils forment la flore commensale et permettent de créer une barrière contre des agents pathogènes. Cependant, ces biofilms ne sont pas néfastes aux plantes à l'état normal, mais en cas de déséquilibre du milieu, ils peuvent être à l'origine d'infections. Ainsi, une déchirure de la feuille peut permettre le passage des bactéries dans leur hôte.

Dans le domaine médical, l'installation de biofilm sur la peau et dans les intestins peut être bénéfique. En effet, comme pour la plante, les bactéries commensales structurées en biofilm offrent une protection en limitant l'installation de bactéries à risque pathogène. Par exemple, la muqueuse de l'intestin est colonisée par des biofilms bactériens permettant d'y former une barrière contre des agents pathogènes qui souhaiteraient s'y installer. De même, les biofilms intestinaux contribuent à la digestion chez certains animaux ruminants. Cependant, les biofilms dans ce domaine sont le plus souvent synonymes de maladies infectieuses voire chroniques. La formation de biofilms sur une paroi vivante (biotique) peut être bénéfique quand elle est contrôlée mais devenir dangereuse en cas de trop forte expansion comme c'est le cas avec la plaque dentaire (Fernandes, Bhavsar et al. 2018). De

même la colonisation d'une plaie extérieure par *Staphylococcus aureus* présent sur la peau à l'état normal, peut être à l'origine d'infections cutanées comme les furoncles mais aussi d'infections aiguës telles une septicémie. Les biofilms sont aussi à l'origine de maladies chroniques grâce à leur capacité à se reconstruire après traitement et à coloniser de nouveaux espaces (Bjarnsholt, 2013). Ces maladies sont difficiles à éradiquer car les symptômes sont moins décelables et les bactéries résistent mieux aux antibiotiques (Wu, Moser et al., 2015). Dans les hôpitaux, ces infections dues aux biofilms sont des enjeux majeurs. Les biofilms se développent sur les surfaces en contact avec les patients durant leur hospitalisation provoquant des maladies dites nosocomiales. Ils ont ainsi été retrouvés sur des pansements, du matériel de suture, des cathéters, des pacemakers, des prothèses, des sondes, des stérilets et même des lentilles de contact (Pajkos, Vickery et al., 2004, Santos, Watanabe et al., 2011, Abidi, Sherwani et al., 2013). Ces maladies toucheraient en France un patient sur vingt et 80% des maladies nosocomiales contractées dans les hôpitaux sont dus à des biofilms (Marques, Rezende et al., 2007, Paredes, Alonso-Arce et al., 2014). Dans le cas de patients atteints de mucoviscidose les biofilms, particulièrement de *Pseudomonas aeruginosa*, sont la première cause de mortalité (Singh, Schaefer et al., 2000).

Dans le domaine de l'industrie, les biofilms peuvent être utilisés à des fins économiques. Ils sont nécessaires dans certaines industries comme dans le procédé de traitement des eaux usées dans les stations d'épuration ou la maturation de certains fromages. En biotechnologie des bioréacteurs utilisant des biofilms sont capables de fournir des antibiotiques ou de l'acide acétique (vinaigre) (Sarkar, Mukherjee et al., 2009). Malgré ces intérêts économiques, la présence de biofilms dans le domaine agroalimentaire est souvent la cause de graves toxi-infections (Galie, Garcia-Gutierrez et al., 2018). Ils se développent sur les surfaces en contact avec les aliments durant toute la chaîne de production et contaminent les produits finaux (Corcoran, Morris et al., 2014). Par exemple, les bactéries *Listeria monocytogenes* sont connues pour former des biofilms sur les parois des réfrigérateurs car elles peuvent se reproduire à des températures allant jusqu'à 0°C (Puga, SanJose et al., 2016). Dans l'industrie de l'eau potable la formation de biofilms dans le réseau de production et de distribution (« biofouling ») peut entraîner la résistance des bactéries en contact avec les faibles doses de produits traitants et la libération de toxines dans l'eau (Chattopadhyay, 2016). Des biofilms de *Legionella pneumophila* dans les tuyauteries des tours réfrigérées, systèmes

de climatisation ou de distribution d'eau chaude ont déjà provoqué des crises sanitaires par le passé (*Abu Khweek and Amer, 2018*). Dans l'industrie leur présence sur les surfaces d'échangeur de chaleur diminue le coefficient de transfert de chaleur et donc l'efficacité de ces infrastructures (*Culha, Gunerhan et al., 2015*). Dans une moindre mesure, les biofilms peuvent dégrader la qualité des aliments ou de l'eau potable sans provoquer d'infections. Cependant, la contamination d'une installation entière peut conduire à la fermeture d'une partie ou de la totalité de l'usine.

1.2.4. La résistance des biofilms bactériens à l'environnement et aux désinfectants

Les bactéries afin de survivre aux conditions défavorables de l'environnement et aux traitements physiques et chimiques se structurent au sein d'une forteresse où elles mutualisent leurs moyens de défense. Par cette organisation et mutualisation les bactéries deviennent beaucoup plus résistantes que sous forme planctonique et solitaire (*Ceri, Olson et al., 1999*). Les moyens de défense d'un biofilm contre les agressions extérieures sont multiples et dépendent beaucoup de l'hétérogénéité de composition en bactéries du biofilm.

La matrice d'exopolysaccharides est le premier rempart dans la défense d'un biofilm. Elle permet le maintien des bactéries au sein d'une structure et joue un rôle de barrière aux agents désinfectants (*Ghafoor, Hay et al., 2011*). Son efficacité dans la défense du biofilm fluctue avec sa composition et sa densité. Elle joue un rôle dans la sélection des molécules échangées entre le milieu et le biofilm. Cette sélection se fait à la fois sur la taille mais surtout suivant la charge de la molécule (*Mah, Pitts et al., 2003*). Des molécules désinfectantes de très petite taille telles que les ammoniums quaternaires, ne se diffusent pas correctement dans le biofilm à cause de leurs interactions électrostatiques avec la matrice et la charge de surface des bactéries prisonnières (*Spoering and Lewis, 2001*). De plus, le rôle de la barrière formée par la matrice d'exopolysaccharides peut se traduire par une interférence avec l'agent désinfectant. Par exemple, l'hypochlorite de sodium connu pour réagir avec toute matière organique rencontrée, va oxyder aussi bien les bactéries que l'EPS. Cependant, l'EPS étant omniprésent dans le biofilm, les molécules d'hypochlorite de sodium auront déjà réagi avant de pouvoir atteindre les bactéries les plus enfouies (*Bridier, Briandet et al., 2011*). L'épaisseur de cette barrière permet aussi aux bactéries plus en profondeur d'être protégées par celles en surface qui seront les premières à être touchées par le biocide. Un gradient de concentration en biocide se forme sur l'épaisseur du biofilm. Ainsi, les bactéries dans le cœur

du biofilm sont atteintes par une concentration en désinfectant amoindrie et les couches de bactéries mortes peuvent jouer le rôle d'interfèrent lors d'un prochain traitement (*De Beer, Srinivasan et al., 1994*). De plus, ces bactéries mortes lors d'un premier traitement servent de ressources en nutriments aux survivantes. Les bactéries pratiquent alors le cannibalisme ou croissance cryptique, afin de reformer une structure sur l'ancienne partiellement détruite après traitement. En effet, si après chaque traitement il reste encore une base de bactéries viables, le biofilm va pouvoir être reconstruit rapidement et s'enrichir en matière organique. Le traitement pour qu'il soit réellement efficace doit se faire jusqu'à disparition totale du biofilm (*Kose and Yapar, 2017*).

Au sein du biofilm un gradient se forme aussi selon l'activité métabolique des bactéries. Les bactéries les plus actives métaboliquement se situent en proximité de la surface et les moins actives au cœur du biofilm (*Folsom, Richards et al., 2010*). Comme vu précédemment, cette différence d'activité est due à la diffusion des nutriments des couches extérieures vers l'intérieur du biofilm. Ces nutriments sont consommés par les bactéries lors de leur diffusion, ce qui ne laisse plus qu'aux bactéries les plus profondes des quantités amoindries (*Brown and Gilbert, 1993*). Les bactéries ne pourront alors pas déployer l'ensemble de leur activité métabolique énergivore au point qu'au cœur du biofilm la synthèse de molécules peut être stoppée (*Khemiri, Jouenne et al., 2016*). Les antibiotiques et autres antimicrobiens sont beaucoup moins actifs sur ces bactéries dont le métabolisme est ralenti et le processus de division cellulaire est inexistant.

La promiscuité des bactéries au sein du biofilm engendre des échanges d'information génétique par des transferts de gènes. Les biofilms sont des endroits propices à ces échanges qui permettent aux bactéries d'acquérir de nouvelles propriétés génétiques comme la résistance aux antibiotiques (*Mah, Pitts et al., 2003*). Ce transfert peut se faire de plusieurs façons différentes entre bactéries. Le premier processus d'échange se fait préférentiellement entre bactéries de la même espèce, c'est la conjugaison. La bactérie forme une voie d'échange avec une bactérie voisine grâce à un pili sexuel par lequel est transféré un petit ADN circulaire, appelé plasmide (*Bower and Daeschel, 1999, Reisner, Haagenen et al., 2003*). Le suivant est l'incorporation d'ADN libre dans le milieu après la lyse d'une bactérie, par le processus dit de transformation. L'acquisition de nouvelles propriétés génétiques peut aussi se faire par l'incorporation d'ADN via un virus. Ce phénomène est appelé la transduction. Les bactéries

colonisant de nouvelles surfaces peuvent être plus résistantes en ayant acquis de nouvelles modifications épigénétiques ou génétiques lors de leur vie dans le biofilm.

Cette promiscuité au sein d'un même biofilm permet aussi aux bactéries de mutualiser leur moyen de résistance. Ainsi, certaines bactéries productrices de catalase vont pouvoir faire bénéficier à l'ensemble des espèces présentes du biofilm cet outil de résistance contre des désinfectants comme le peroxyde d'hydrogène (*Cochran, McFeters et al., 2000, Stewart, Roe et al., 2000*). De même, certaines vont pouvoir métaboliquement créer un environnement propice à l'installation d'une autre espèce comme la création de zones anaérobies. Enfin, des bactéries peuvent profiter de l'existence d'un biofilm pour s'y greffer. Ainsi, certaines bactéries d'espèces pathogènes peuvent s'installer au sein d'un biofilm ne comportant que des espèces non pathogènes. Les espèces pathogènes bénéficient alors de la protection du biofilm déjà organisée et pourront plus facilement survivre.

Un autre phénomène important dans la résistance des bactéries au sein d'un biofilm est leur adaptation aux stress environnementaux. En effet, les bactéries sont capables de s'adapter à de petites quantités de biocides, à l'absence de nutriments, aux variations de températures et à des pH extrêmes (*Marion, Pasmore et al., 2005*). Cela se traduit par l'accoutumance des bactéries aux pressions environnementales et aux désinfectants. Par exemple, les bactéries mises en contact périodiquement à de petites quantités d'un produit toxique vont pouvoir s'adapter à cette substance et survivre à de très fortes concentrations. En plus de cette adaptation physiologique, les bactéries vont s'adapter à un stress en réorganisant la structure du biofilm pour une forme plus résistante (*Parsek and Tolker-Nielsen, 2008*). Ainsi, certains biofilms aplatis se restructurent dans une forme beaucoup plus résistante de « champignon » quand la quantité en bactéries devient importante. De même, des bactéries en contact avec de l'hypochlorite de sodium produisent plus de matrice afin d'interférer avec une future exposition à ce désinfectant (*Bridier, Briandet et al., 2011*).

Ainsi, les biofilms bactériens sont résistants grâce à la présence d'exopolysaccharides formant une barrière entre l'environnement et les bactéries, d'une différence d'activité des bactéries au sein du biofilm, d'un échange d'information entre bactéries et de la mutualisation de leurs moyens de défense. Leur résistance aux désinfectants est souvent observée lors de la mise en œuvre de procédés de décontamination dans les domaines hospitaliers et agroalimentaires.

1.3. Les nouveaux procédés de décontamination sous forme de mousse

1.3.1. Les moyens de décontamination existants

Comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes, la présence de contamination bactérienne sur les surfaces et le matériel est une préoccupation majeure dans divers domaines dont l'agroalimentaire, la santé et la défense. Dans un premier temps, il est possible de travailler sur les propriétés du support soit pour éviter l'installation de contamination comme les biofilms ou pour faciliter la décontamination (*Bruzaud, Tarrade et al., 2017*). Ainsi, des études sont menées pour développer des surfaces empêchant l'adhésion des micro-organismes ou des peintures et textiles neutralisant directement les bactéries qui s'y fixent (*Siedenbiedel and Tiller, 2012*). De plus, dans le domaine de la décontamination en cas d'attentats ou d'accidents, l'efficacité d'un traitement de décontamination dépend du matériau contaminé. Par exemple, un support poreux comme le mortier ou le bois est difficile à décontaminer. Il est donc préférable d'opter pour un autre matériau plus facile à décontaminer comme le verre ou l'acier lors de la construction des infrastructures sensibles (*Rogers, Sabourin et al., 2005*).

Le plus souvent le traitement de la contamination se fait quand celle-ci est déjà présente sur la surface. Ils existent un large panel de techniques pour le traitement des microorganismes sur les surfaces. Ces techniques peuvent être physiques ou chimiques.

Les traitements physiques regroupent différentes techniques comme l'utilisation des radiations UV ou gamma, la chaleur humide ou sèche, les fortes ou basses pressions, les champs électriques pulsés, les champs magnétiques pulsés, l'ionisation, les lumières pulsées, ... (*Setlow, 2006, Buhr, Young et al., 2012, van Bokhorst-van de Veen, Xie et al., 2015*). Ils impactent les bactéries par électroporation de la membrane et par modifications chimiques conduisant au clivage de l'ADN, à la dénaturation des protéines et à l'oxydation des lipides. Ils permettent de générer très peu d'effluents et de ne pas provoquer d'accoutumance des bactéries aux traitements (*Ziuzina, Patil et al., 2014*). Ces procédés physiques de décontamination sont difficiles à déployer sur le terrain en cas d'attentats ou d'accidents biologiques.

Les processus de décontamination se font en majorité par traitements chimiques. Ces traitements sont définis par la réglementation concernant la mise à disposition sur le marché

et l'utilisation des produits biocides (n° 528/2012 du 22/05/12) (INERIS, 2012). Les produits biocides représentent l'ensemble des substances et mélanges (une ou de plusieurs molécules actives) destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles vivants, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique. Ils sont divisés en différentes catégories suivant leurs applications : les antiseptiques destinés à être appliqués sur la peau ou les muqueuses externes, les antibiotiques prescrits pour une utilisation *in vivo* et les désinfectants applicables pour des surfaces inertes. Ces derniers servent notamment à traiter les dispositifs médicaux, les sols, les surfaces de matériaux contaminés. L'efficacité des désinfectants est dépendante de leur spectre d'action sur les différents types d'agents biologiques. Ils sont catégorisés en fonction de leur cible avec les bactéricides pour les bactéries, les fongicides pour les champignons, les virucides pour les virus et les sporicides pour les spores. Un désinfectant a plusieurs critères de performance. Ainsi, son choix se fait en fonction de la vitesse d'efficacité du produit, de son efficacité de décontamination et de sa compatibilité avec les surfaces (Humphreys, 2011). Tous les désinfectants n'ont pas la même efficacité de désinfection. Le niveau d'efficacité de désinfection des principaux désinfectants est décrit dans le Tableau 2 ci-dessous (Environmental Protection Agency, 2010, Amoako, Santiago-Mateo et al., 2013).

Niveau de désinfection	Principaux désinfectants
Haut	Formaldéhyde, glutaraldéhyde, hypochlorite de sodium, acide peracétique et peroxyde d'hydrogène
Moyen	Dérivés phénoliques, éthanol, alcool isopropylique à 70°
Bas	Ammoniums quaternaires, amphotères, aminoacides

Tableau 2. L'efficacité de désinfection des principaux désinfectants

Les désinfectants ayant un haut niveau de désinfection sont répartis en différentes familles de produits chimiques (Russell, 1990, McDonnell and Russell, 1999).

Ces biocides sont utilisés dans différents procédés de désinfection : sous forme liquide (berlingot), de lingettes imprégnées, en spray ou en fumigation. Pour notre étude sur les formes de résistance bactériennes, nous avons choisi deux désinfectants parmi ceux rencontrés dans la littérature, l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène.

- L'hypochlorite de sodium (NaOCl) : Communément appelé eau de Javel, ce biocide de la famille des produits chlorés, est un bactéricide, virucide, fongicide et sporicide connu. L'hypochlorite de sodium est utilisé comme désinfectant de surfaces, d'effluents liquides et de matériels. Leur utilisation est soumise à précautions car il peut irriter les muqueuses pulmonaires par voie aérienne et brûler la peau par contact liquide. De plus, il est instable, corrosif et oxyde certains matériaux (Young and Setlow, 2003, Barbut, Menuet et al., 2009, Pereira, de Oliveira et al., 2015). En effet, suivant son temps d'application et sa concentration, ce désinfectant peut corroder les surfaces avec lesquelles il est mis en contact et surtout celles métalliques (Heninger, Anderson et al., 2009, Kose and Yapar, 2017). Son action sporicide proviendrait de la destruction sur la membrane interne des récepteurs à nutriments et de ceux nécessaires à la lyse du cortex durant la germination. Ces récepteurs endommagés ainsi que des dégâts sévères sur la membrane interne empêcheraient partiellement ou totalement la germination des spores. Ainsi, les spores survivantes pouvant germées ont plus de mal à croître et forment de plus petites colonies (Young and Setlow, 2003). Enfin, son efficacité peut être impactée par la présence de substances interférentes contenant de la matière organique comme le sang ou les aliments (Edwards, Karim et al., 2016).
- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : Ce désinfectant de la famille des oxydants, aussi appelé eau oxygénée, est un bactéricide, virucide, fongicide et sporicide mais son efficacité dépend beaucoup de son temps de contact avec la contamination et de sa concentration (Russell, 1990, Labas, Zalazar et al., 2008). Il est souvent utilisé en fumigation et associé avec de l'acide peracétique (Otter, Mephram et al., 2016). Son utilisation permet de ne laisser aucuns résidus toxiques après traitement et n'est pas dangereuse pour les opérateurs et l'environnement (Rios-Castillo, Gonzalez-Rivas et al., 2017). Son action sur les spores n'impacte pas leur ADN mais cible plutôt les enzymes métaboliques nécessaires à la germination présentes dans le core. Il a été étudié que les spores traitées avec ce désinfectant peuvent germer mais que la germination ne peut aboutir (Melly, Cowan et al., 2002). Sur les bactéries, le peroxyde d'hydrogène agit par la formation de radicaux libres hydroxyles (OH[•]) provoquant la dénaturation des composants cellulaires (Denyer and Stewart, 1998, Linley, Denyer et al., 2012). Suivant la concentration en peroxyde d'hydrogène, la présence de catalase produite par les organismes aérobies et anaérobies

facultatifs peut diminuer l'efficacité de décontamination de ce désinfectant (*McDonnell and Russell, 1999, El-Azizi, Farag et al., 2016*).

Tous ces procédés de désinfection, qu'ils soient physiques ou chimiques, ont des limites d'utilisation ou de performance et aucun d'entre eux n'est polyvalent. De nouveaux procédés sont développés afin d'augmenter la polyvalence, l'efficacité et la facilité de mise en œuvre de ces désinfectants. L'utilisation de mousses contenant un désinfectant à haut pouvoir actif a été étudiée dans ce travail. Ce sont l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène qui sont choisis pour leur facilité d'utilisation et d'approvisionnement. L'objectif est de quantifier leur efficacité sous forme de mousse.

1.3.2. La mousse

Ce chapitre vise à présenter les mousses et leur mode d'action de décontamination sur une surface solide de façon simple, afin de dégager les paramètres physico-chimiques pertinents de la mousse pour l'étude.

1.3.2.1. Généralités sur les mousses aqueuses

Les mousses aqueuses font partie de notre quotidien que ce soit au rayon des desserts, en buvant une bière, en prenant son bain ou en faisant l'isolation des combles. Leur utilisation dans différents domaines se justifie par un attrait économique. Par exemple, dans le domaine agroalimentaire, les mousses produisent une meilleure sensation dans la bouche et ont une forte valeur ajoutée. Dans celui de l'industrie, leur utilisation permet d'atteindre des endroits difficiles d'accès grâce à leur pouvoir d'expansion et de projection. Dans celui de la décontamination l'utilisation des mousses permet de générer moins d'effluents après traitement. Leur emploi dans une multitude de domaines a permis d'acquérir de nombreuses connaissances sur cette structure variable et instable.

Le principe de génération d'une mousse est d'incorporer de l'air dans une solution liquide potentiellement moussante. Le volume de mousse généré est supérieur au volume de solution moussante utilisé. Cette différence de volume est mesurée par le foisonnement selon la formule suivante :

$$\text{Foisonnement} = \frac{\text{Volume de mousse généré}}{\text{Volume de solution moussante}}$$

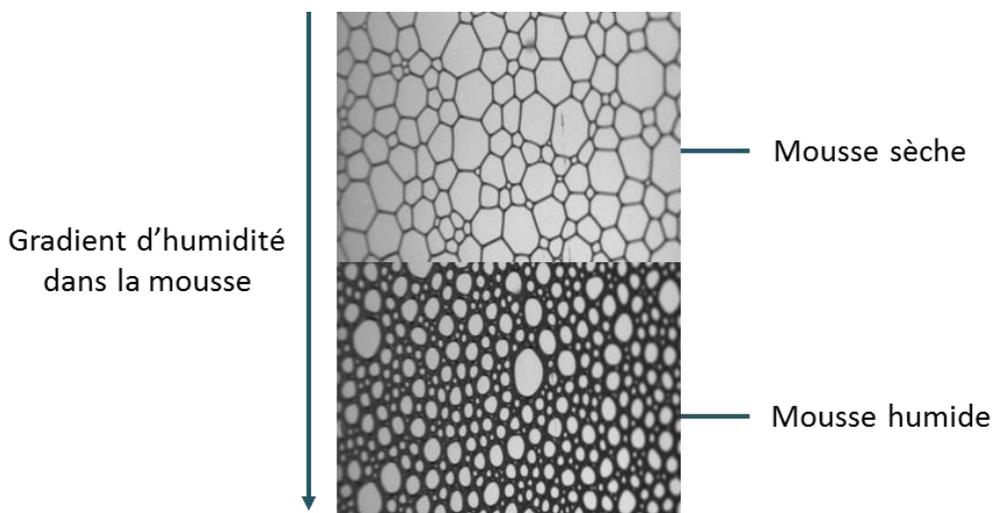
Les mousses peuvent être réparties suivant trois catégories de foisonnement :

- De 0 à 20 les mousses ont un bas foisonnement,
- De 20 à 200 les mousses ont un foisonnement moyen,
- De 200 et plus les mousses ont un haut foisonnement.

Cette notion de foisonnement est étroitement liée à celle de la fraction liquide ε de la mousse suivant la formule ci-dessous :

$$\varepsilon = \frac{1}{\text{foisonnement}} \times 100\%$$

La fraction liquide de la mousse est une notion importante permettant de les classer en deux catégories, les mousses sèches et celles humides. Les mousses dites humides contiennent une fraction de liquide élevée. Le pourcentage d'humidité de ces mousses est supérieur à 5% et peut atteindre 30% (*Hilgenfeldt, Koehler et al., 2001*). Les mousses dites sèches contiennent moins de liquide avec un pourcentage d'humidité inférieur à 5%. Sous l'effet du vieillissement par drainage gravitationnel, un gradient d'humidité apparaît au sein même de la mousse qui est détaillé dans la partie suivante (Figure 7). Les mousses utilisées pour notre étude sont des mousses sèches.



1.3.2.2. La formulation de la mousse

La formulation de la solution moussante décontaminante dépend de son utilisation, par exemple acide ou oxydante pour corroder un substrat et alcaline pour dégraisser (Faure, Fournel et al., 2002). Ainsi la solution moussante est composée de trois familles de produits : le tensioactif, le stabilisant et le réactif décontaminant.

1.3.2.2.1. Les tensioactifs

N'importe quel liquide ne peut pas devenir une mousse. Pour qu'une solution liquide puisse mousser, il faut qu'elle contienne des molécules particulières. Ces molécules permettent aux bulles d'être plus stables. Sans molécules stabilisatrices les bulles formées sont immédiatement détruites en cas de contact avec d'autres bulles ou à la surface du liquide. Pour les mousses, ces molécules appelées tensioactifs moussants, modifient les propriétés de l'interface bulles de gaz/liquide moussant en s'adsorbant sur celle-ci.

Les tensioactifs peuvent être très différents d'une mousse à l'autre : des protéines pour des mousses alimentaires (l'albumine pour les mousses au chocolat), ou des alkylpolyglucosides pour les mousses de décontamination radiologiques. Elles peuvent contenir en plus des stabilisants, des particules ou des polymères (Guignot and Faure, 2008). Les molécules tensioactives sont amphiphiles et comportent donc une partie hydrophile (affinité avec l'eau) et une partie hydrophobe (aucune affinité avec l'eau) reliées entre elles par une liaison covalente. La partie hydrophobe est une longue chaîne hydrocarbonée, tandis que la partie hydrophile peut être anionique, cationique, non ionique ou zwitterionique (possédant une charge positive et négative). En effet, les tensioactifs s'adsorbent à l'interface air-liquide jusqu'à former une monocouche, ce qui diminue l'énergie interfaciale (l'interface est stabilisée). Par cette configuration le tensioactif va chercher à s'absorber à l'interface air-liquide jusqu'à former une monocouche. La partie hydrophobe se place à l'interface de l'air et la partie hydrophile restera immergée dans le liquide comme représenté en Figure 8 (Langevin, 1998).

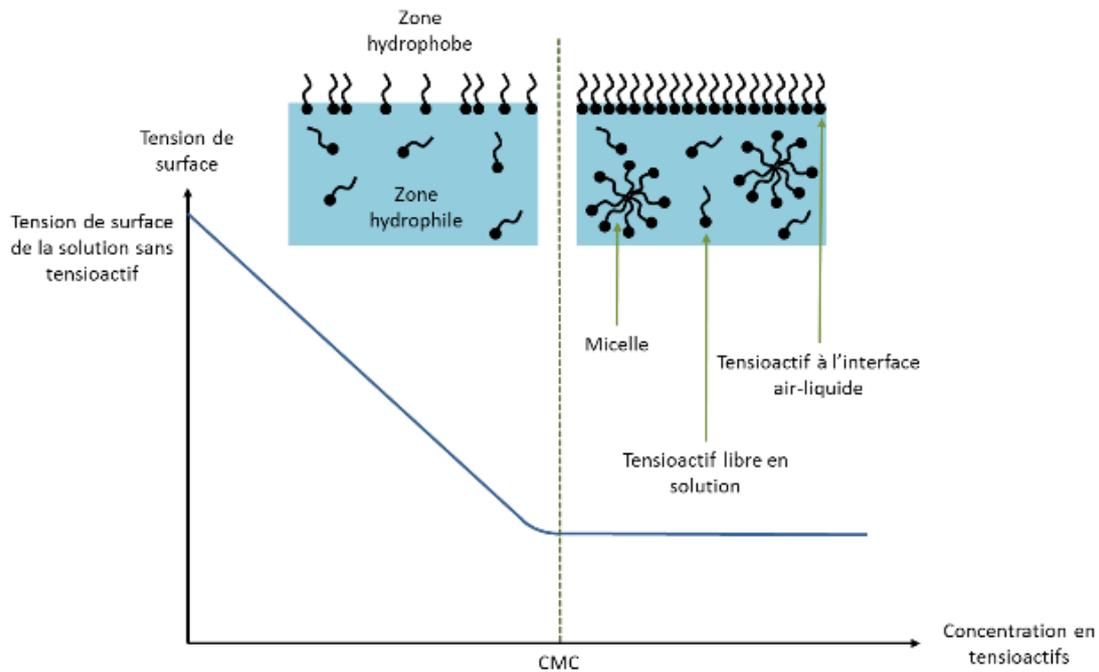


Figure 8. Représentation schématique du comportement des tensioactifs suivant leur concentration dans la solution et son effet sur la tension de surface à l'interface air-liquide (Langevin, 1998)

Si la quantité en tensioactifs est supérieure à la quantité pouvant recouvrir l'interface air-liquide, les molécules de tensioactifs forment des micelles (agrégats de 50 à 220 molécules de tensioactifs). Un échange dynamique a lieu en permanence entre les molécules composant les micelles, celles en suspension dans la solution et celles à l'interface air-liquide. La concentration limite à partir de laquelle les tensioactifs ont saturé la zone d'interface et forment des micelles, est appelée Concentration Micellaire Critique (CMC). La CMC est dépendante du tensioactif utilisé et des additifs (sels) présents dans la solution. La concentration totale en tensioactifs doit être légèrement supérieure à cette CMC afin de disposer de suffisamment de tensioactifs libres qui peuvent stabiliser les interfaces créées lors du moussage. L'utilisation de tensioactifs fait baisser la tension superficielle de la solution ou l'énergie interfaciale. Ces molécules créent un déficit d'attractivité du côté de l'air attirant les molécules d'eau vers l'intérieur du liquide et réduisant l'interface air-liquide (les gouttes sont sphériques). Ce déficit est compensé par l'apport d'une énergie appelée tension superficielle nécessaire pour maintenir les molécules à la surface du liquide. Cette tension interfaciale aussi appelée tension de surface est de 72 Mn.m^{-1} pour l'eau pure à 25°C . Elle diminue avec l'augmentation de la quantité de tensioactifs à l'interface air-liquide, jusqu'à saturation de

l'interface en tensioactifs. La tension interfaciale atteint alors un plateau minimal pour une interface saturée à partir de la CMC lorsque les molécules tensioactives s'organisent en micelles (*Patino, Sanchez et al., 2008*). Le tensioactif utilisé dans cette étude est un alkyl polyglucoside non ionique, le GlucoPON®.

1.3.2.2.2. Les stabilisants

L'augmentation de la stabilité d'une mousse est favorisée par la réduction de la taille des bulles ou l'augmentation de son élasticité et de sa viscosité (*Zuniga and Aguilera, 2008*). Il existe plusieurs mécanismes qui permettent d'augmenter la stabilité de la mousse (*Murray, 2007*).

Le premier est la stabilisation stérique. Elle consiste en l'incorporation de macromolécules s'absorbant sur les films des bulles. Ces macromolécules forment alors une barrière physique entre les bulles et augmentent la distance entre celles-ci (*Alargova, Warhadpande et al., 2004*).

Le deuxième est la stabilisation électrostatique. Suivant les ions présents dans le milieu, les bulles sont entourées d'une double couche d'ions dont le nombre de positifs et équivalent à celui en négatifs. Le rapprochement de deux bulles entourées de cette double couche électrique engendre une répulsion électrostatique. Cette répulsion diminue la coalescence de la mousse (*Bergeron, 1997*).

La troisième est la stabilisation électrostérique. Elle correspond à la combinaison des deux stabilisations décrites ci-dessus par l'ajout dans la formulation de macromolécules comportant un groupement ionique. Il va y avoir un effet de stabilisation stérique de courte portée par les macromolécules et de stabilisation électrostatique de longue portée par la charge ionique (*Asnacios, Bergeron et al., 1997*).

Enfin le dernier mécanisme est la stabilisation rhéologique. L'incorporation d'un ou plusieurs additifs permet le maintien de la mousse par l'augmentation de la viscosité du liquide ou du module viscoélastique de la mousse (*Narchi, 2008*). Les agents stabilisants permettent donc de limiter la mobilité des bulles dans la mousse et de diminuer leur probabilité à fusionner entre elles. Par ces additifs il est possible de gélifier la mousse (protéines ou gélifiants dans le domaine alimentaire) voire de la solidifier (mousses polyuréthanes utilisées en isolation thermique). La stabilisation des mousses de cette étude

est effectuée grâce à l'incorporation de gomme de Xanthane rhéofluidifiante qui agit surtout sur la viscosité et sur la cinétique de drainage (voir paragraphe 1.3.2.4.3.).

1.3.2.3. Structure d'une mousse aqueuse

La mousse est une structure instable composée de différentes parties reliées entre elles comme illustré en Figure 9 (Pouvreau, 2002).

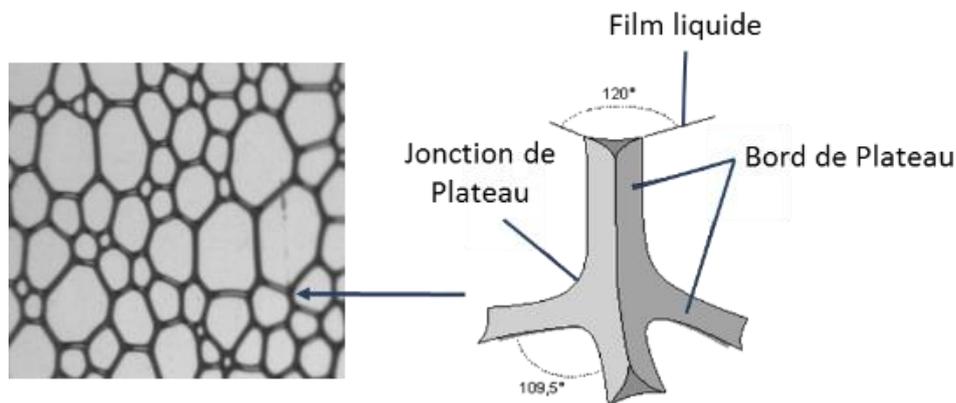


Figure 9. Structure d'une mousse avec une représentation schématique des jonctions de Plateau, bords de Plateau et film liquide

Les bulles sont séparées entre elles par un mince film liquide. Pour une mousse dite sèche les bulles ont une forme polyédrique alors que les mousses humides auront des bulles plus sphériques. La transition mousse sèche-mousse liquide se situe aux environs de 5% en fraction liquide (Hilgenfeldt, Koehler et al., 2001). La répartition en bulles n'est pas figée et évolue avec le vieillissement de la mousse. La taille des bulles lors de la création de la mousse dépend en partie de la technique utilisée afin de générer la mousse.

La jonction de trois films liquides se rejoignant en angle de 120° forme un bord de Plateau. Ces bords de Plateau forment des canaux interconnectés permettant l'écoulement du liquide lors du processus de drainage de la mousse. Ces canaux formant l'ossature de la mousse se rejoignent par quatre en une jonction de Plateau stable. A cette jonction de Plateau, les bords de Plateau sont espacés entre eux d'un angle de 109° formant ainsi un tétraèdre. La taille et la courbure des canaux dépendent du nombre de bulles et de l'humidité de la mousse. Pour une mousse sèche les canaux ont une longueur supérieure à leur courbure et les bords de Plateau sont très fins (Bhakta and Ruckenstein, 1996).

En plus, de cette structure, la mousse est capable de former un film de mouillage lors de son contact avec les surfaces. Son épaisseur varie en fonction de la fraction liquide de la mousse et de l'âge de la mousse (*Dame, Fritz et al., 2005*). Cependant, la capacité de la mousse à mouiller la surface dépend de sa composition ainsi que de la tension de la surface mise en contact. Ce film de mouillage est primordial dans le domaine de la décontamination car il est directement en contact avec la contamination et permet sa décontamination. L'impact du film de mouillage de nos mousses sur l'efficacité de décontamination sera détaillé dans notre étude.

1.3.2.4. Vie d'une mousse

1.3.2.4.1. Génération

L'incorporation d'un gaz dans un liquide afin de générer de la mousse peut se faire de différentes façons. L'une des techniques pour générer de la mousse est la diminution de la pression. Si le gaz est sous pression dans le liquide, la mousse est générée par dépression comme lors de l'ouverture d'une bouteille de champagne. Certaines réactions chimiques dégagent du gaz, pouvant être utilisé afin de générer des mousses. Par exemple, la réaction du peroxyde d'hydrogène avec de la matière organique ou de la catalase dégage de l'oxygène. Ce procédé est utilisé pour générer des mousses métalliques telles que celles en aluminium. L'utilisation de produits biochimiques et de la température se fait beaucoup dans le domaine alimentaire tel que pour le pain et la bière. L'agitation ultrasonique permet de produire des mousses avec de très petites bulles. Le procédé le plus utilisé reste l'incorporation du gaz dans le liquide par entrainement mécanique. Cela peut se faire par différents mécanismes comme le fouettage (œufs en neige), le bullage (incorporation de l'air dans le liquide à travers un fritté), le barbotage et le brassage. Dans notre cas, la mousse est générée par un générateur statique à billes permettant de maîtriser la fraction liquide de la mousse à l'échelle laboratoire.

1.3.2.4.2. Mûrissement

La mousse nouvellement formée va immédiatement entamer un processus de mûrissement. Un réarrangement des bulles est observé. Certaines bulles diminuent en taille au profit d'autres qui grossissent. Les plus petites finissent par disparaître progressivement et la taille moyenne des bulles tend à augmenter. Ce processus se fait par diffusion du gaz à travers le film liquide entre les bulles plus petites vers celles plus grosses. En effet selon la loi de Laplace, la pression dans les petites bulles est supérieure à celle dans les grosses. Les

petites bulles ayant peu de faces donc de bulles voisines vont tendre à diminuer leur pression en diffusant du gaz vers les bulles ayant de plus grosses faces. L'évolution de la taille d'une bulle dans une mousse dépend de son nombre de faces donc du nombre de bulles voisines (*Stavans, 1999*). De plus, la diffusion est dépendante de différents facteurs comme la solubilité du gaz, la taille des films liquides ainsi que la perméabilité de la couche en tensioactifs.

De plus, un autre phénomène se produit dès la formation de la mousse et modifie la répartition des bulles au sein de la mousse, c'est la ségrégation gravitationnelle. Sous l'effet de la poussée d'Archimède les bulles se déplacent suivant un gradient avec les plus grosses tendant à s'accumuler vers le haut au niveau de la surface avec l'air. Ce phénomène est immédiat après formation de la mousse et se fait en quelques secondes, avant que le phénomène dominant dans la structure devienne le drainage (*Neethling, Lee et al., 2005*).

1.3.2.4.3. Drainage

Le drainage est le processus d'écoulement du liquide dans la mousse qui va tendre à retourner sous l'état liquide. Il se fait entre les bulles au sein du réseau connecté des films liquides et des bords de Plateau.

Le drainage au niveau des films est surtout dû à la pression. En effet, les bords de Plateau ont une concavité supérieure à celles des films liquides. De fait, la pression est plus importante dans le film qu'au niveau du bord de Plateau. Il va donc y avoir un mouvement de migration du liquide des films vers les bords de Plateau. Ce liquide dans les bords de Plateau est ensuite soumis au drainage par gravitation. Ce processus est initié rapidement après formation de la mousse et la stabilisation des films se fait en quelques secondes (*Barigou and Davidson, 1994, Langevin, 2000*).

Le drainage gravitaire est visible sur l'ensemble de la mousse. Le liquide s'écoule entre les bulles par les films et bords de Plateau sous l'effet de la gravité. La partie inférieure de la mousse devient plus humide au détriment de la partie supérieure qui se vide de sa fraction liquide par écoulement et devient plus sèche. Ce gradient de fraction liquide dans la mousse est visible avec une partie supérieure où la mousse sèche présente des films plus fins et des bulles plus grosses, et une partie inférieure plus humide avec des bulles sphériques, plus petites et des films plus épais. L'humidité au sein de la mousse n'est pas homogène sur toute la hauteur de la mousse avec une notion de front de drainage. Le front de drainage représente

le point où la quantité de liquide apportée par le drainage des couches supérieures de la mousse, est inférieure à la quantité de liquide qui draine vers les couches inférieures. La fraction liquide de la mousse au-dessus de ce front de drainage tend à diminuer et la mousse à devenir plus sèche (*Bhakta and Ruckenstein, 1996*).

Le drainage est dépendant de plusieurs facteurs propres à la mousse. Généralement, la vitesse de drainage d'une mousse humide est supérieure à celle d'une mousse sèche. La température, la masse volumique et la tension superficielle avec le choix du tensioactif peuvent influencer la vitesse du drainage. Cependant, des moyens existent afin de retarder le départ du drainage de la mousse. En effet, l'utilisation d'agents gélifiants comme le Xanthane permettent de retarder le drainage et de garder une mousse stable en humidité pendant un temps limité (*Dame, Fritz et al., 2005*). Cette propriété est mise à profit dans cette étude pour la formulation des mousses biocides.

1.3.2.4.4. Coalescence

La coalescence est le processus de rupture du film liquide d'une bulle (*Wang, Nguyen et al., 2016*). Ce phénomène est amorcé lorsque le film liquide entre deux bulles atteint une certaine épaisseur critique devenant trop fine et instable. Elle peut se faire à deux niveaux :

- soit sur le dessus de la mousse quand les bulles se rompent provoquant une diminution de la hauteur de la mousse,
- soit par la rupture d'un film entre deux bulles au sein même de la mousse provoquant l'augmentation de la taille d'une des bulles. Ce dernier phénomène fait partie du mûrissement de la mousse (*Monin, Espert et al., 2000*).

L'épaisseur critique du film et la vitesse de coalescence de la mousse dépend de la nature de la mousse. La formulation joue un rôle primordial dans la vitesse de drainage et donc de coalescence. Ainsi certains composants permettent de retarder le retour à l'état liquide de la mousse alors que des impuretés vont augmenter la vitesse de ce processus (*Weaire and Phelan, 1996*). De plus, les conditions environnementales et les perturbations mécaniques jouent un rôle sur la durée de vie de la mousse.

La coalescence permet le retour total de la mousse à l'état liquide. La quantité de liquide récupérée après coalescence de toute la mousse est généralement inférieure à celle

utilisée pour la former. Ceci peut être imputé à l'évaporation d'une partie du liquide à l'interface air-mousse de la mousse (Langevin, 2000).

1.3.2.5. Rhéologie des mousses

La rhéologie est l'étude de l'écoulement et de la déformation de la matière en fonction des contraintes imposées. Suivant la force de contrainte appliquée à la mousse, elle peut subir un changement de forme ou une modification de structure (Weaire and Phelan, 1996).

La mousse est un fluide visco-élastique possédant une élasticité et une viscosité propres. Sous contrainte de déformation faible, les mousses présentent généralement un comportement élastique. La mousse subit alors un changement de forme réversible. La mousse va avoir le même comportement qu'un ressort et pouvoir reprendre sa forme après arrêt de la contrainte. C'est par exemple le cas avec une mousse à raser qui a une forme solide dans les mains et qui subit peu de contraintes (Guillermic, 2011). Cette élasticité est dépendante de l'humidité de la mousse et de la taille de ses bulles.

L'élasticité de la mousse provient de l'élasticité des films de mousses et de l'élasticité des interfaces avec les bulles. L'élasticité de Gibbs E_{Gibbs} de l'interface des bulles correspond à la réponse de la tension interfaciale γ à une augmentation relative de la surface A (Guignot, 2008, Langevin, 2014):

$$E_{Gibbs} = \frac{d\gamma}{d\ln A}$$

La mousse devient plastique quand la force de contrainte appliquée devient plus importante. Pour reprendre l'exemple de la mousse à raser, celle-ci est sculptable en appuyant plus fort dessus, ce qui correspond à un comportement plastique. La mousse ne va pas reprendre sa forme immédiatement voire plus du tout. Cependant, la mousse reste sous forme solide jusqu'à ce que la contrainte dépasse un certain seuil nommé τ_y (contrainte seuil). Au-dessus de ce seuil de contrainte la mousse va se comporter comme un liquide ou un fluide visqueux. Elle va subir une modification de sa structure. En reprenant l'exemple de la mousse à raser, ce comportement peut être illustré par son étalement. Ce seuil de contrainte dépend aussi de l'humidité de la mousse et de la taille des bulles.

La viscosité influence la solidité de la structure de la mousse aux niveaux des bords de Plateau et des films interbulles. De même, une haute viscosité permet de limiter

l'amincissement des films liquides permettant de les stabiliser à plus long terme. De plus, elle joue un rôle sur la vitesse de drainage qui diminue quand la viscosité augmente (*Salager and Choplin, 2008*).

1.4. Conclusion de l'étude bibliographique et problématiques de la thèse

Cette étude bibliographique a permis de nous intéresser à la spore bactérienne comme forme de résistance. Sa structure en multicouche contribue à lui conférer une forte résistance aux agressions physiques et chimiques survenant dans l'environnement. L'exosporium, la couche la plus externe, a un rôle dans la résistance des spores aux antibiotiques et à l'adhésion de celle-ci sur les parois. Le manteau est une barrière initiale contre certains produits chimiques comme H₂O₂ et NaOCl et les perturbations mécaniques. Le cortex permet le maintien de la pression osmotique du core et donc de sa faible teneur en eau. Enfin, la membrane interne est immobile et quasiment imperméable ce qui protège le core des agents chimiques ciblant l'ADN.

L'acquisition de ces multiples couches et son passage dans un état de dormance est possible grâce au processus de sporulation. Ce processus permet aux bactéries d'acquérir les moyens de résister aux traitements physiques et chimiques. Sous forme sporulée la bactérie va pouvoir survivre dans un milieu défavorable avant de retourner dans un environnement plus propice à sa croissance et redevenir pathogène grâce à la germination.

Les spores ont un impact sanitaire connu dans différents domaines. Dans celui de l'agroalimentaire, elles provoquent de graves toxi-infections. Dans le milieu hospitalier, elles sont à l'origine de maladies transmises par les systèmes de ventilation et d'aération. Les spores de *Bacillus anthracis* sont un enjeu majeur dans le milieu vétérinaire où elles provoquent la maladie de Charbon aux bétails, mais aussi comme potentielle arme biologique. Elles ont déjà été utilisées lors d'attentats en 2001 aux Etats-Unis avec des lettres contenant les spores. La grande résistance des spores face aux traitements physiques et chimiques diminue l'efficacité des moyens de décontamination existants. En effet, en plus de sa structure multicouche, le core de la spore est fait pour résister aux traitements. Il est très peu hydraté, faiblement perméable et contient une grande part de minéraux comme le DPA qui maintient cette hydratation. De plus, l'ADN contenu dans le core est protégé par des protéines propres aux spores (SASP type α - β) et son système de réparation se met très rapidement en place lors de la germination.

L'étude bibliographique présente une seconde forme de résistance bactérienne, les biofilms. Les biofilms sont des structures tridimensionnelles constituées de bactéries et d'une

matrice d'exopolysaccharides. La répartition des bactéries au sein du biofilm contribue à leur résistance face aux agents biocides. L'exopolysaccharide contribue à l'ancrage du biofilm sur la surface et à la résistance des bactéries aux traitements mécaniques et chimiques en formant une barrière.

La formation des biofilms débute par la colonisation d'une surface biotique ou abiotique idéale à l'adhésion des bactéries. Après vient l'étape d'adhésion qui se fait de façon irréversible, grâce à la sécrétion de molécules d'adhésines et de la matrice d'exopolysaccharides. A partir de cette adhésion irréversible, le détachement des bactéries de la surface nécessite une action mécanique ou chimique forte. Le biofilm entre ensuite dans un processus de maturation caractérisé par une augmentation exponentielle du nombre de bactéries et une importante sécrétion d'exopolysaccharide. Une fois mature, les bactéries vont pouvoir coloniser de nouveaux espaces par le détachement d'une partie du biofilm ou par essaimage. De plus, si après traitement survivent encore quelques bactéries, elles seront alors capables de reformer un biofilm sur l'ancien.

Leur adhésion sur tout type de surface et leur forte résistance aux traitements physiques et chimiques font que les biofilms sont omniprésents dans l'environnement. Ils sont nécessaires au bon fonctionnement de beaucoup d'écosystèmes comme celui de nos intestins ou de notre peau. Cependant, ils peuvent devenir indésirables et même dangereux en cas d'une trop forte expansion et lors d'un changement du milieu. Dans le domaine hospitalier, les biofilms se développent sur le matériel médical en contact avec les patients, provoquant des maladies dites nosocomiales. Dans celui de l'agroalimentaire, ils se développent sur les surfaces en contact avec les aliments tout le long de la chaîne de production et contaminent les produits finaux.

En plus de leur structure et de la présence d'exopolysaccharides, les biofilms sont capables de résister aux agressions extérieures grâce à l'interaction qui existent entre les bactéries. Les bactéries communiquent entre elles afin de collaborer à la survie de la communauté et de mutualiser leur moyens de défense. Elles peuvent aussi échanger de l'information génétique permettant à certaines d'acquérir des résistantes aux antibiotiques et désinfectants. Enfin les bactéries sont capables de s'adapter à un stress environnemental en se réorganisant et en s'accoutumant à des produits chimiques.

Cette étude bibliographique a permis de montrer que les mécanismes de résistance des spores et des biofilms sont maintenant en grande partie connus. Malgré l'ensemble de ces connaissances, il reste difficile de décontaminer entièrement ces deux formes de résistance bactérienne. Les traitements de ces formes de résistance peuvent être physiques (UV, chaleur, pression, ...) ou chimiques sous forme liquide, lingettes imprégnées, spray ou fumigation (hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène, ...). Cependant, tous ces procédés de décontamination ont des limites d'utilisation ou de performances et aucun d'entre eux n'est polyvalent.

L'utilisation de mousses aqueuses à humidité contrôlée contenant un désinfectant à haut pouvoir actif pourrait pallier ce manque. Les mousses sont des procédés connus dans divers domaines comme l'agroalimentaire et la cosmétique. Son principe de génération est simple (mélange air et solution liquide contenant un tensioactif). La quantité de liquide dans la mousse est caractérisée par sa fraction liquide. Celle-ci peut être contrôlée au niveau du générateur afin d'obtenir une mousse suffisamment sèche pour être utilisée par projection ou remplissage. La décontamination des surfaces mêmes verticales par la mousse est possible grâce au film de mouillage que celle-ci va créer sur la contamination. En effet, le film de mouillage apporte directement le désinfectant sur la contamination. Lors du retour de la mousse à l'état liquide par drainage, le désinfectant dans le film de mouillage est renouvelé par gravitation ou écoulement. Son épaisseur et sa stabilité peuvent être des facteurs influençant l'efficacité de décontamination du biocide. Cependant, il est possible d'influer sur ces facteurs par l'incorporation d'un agent stabilisant dans la formulation de la mousse. Cet agent stabilisant va renforcer la stabilité de la mousse en augmentant son élasticité et sa viscosité. De plus, il crée un retard au drainage permettant d'augmenter le temps de contact entre les mousses biocides et la contamination. Enfin, l'utilisation de mousses aqueuses à humidité contrôlée permet de réduire la consommation de matière première mais aussi d'effluents générés après traitement.

L'objet de l'étude suivante est donc de déterminer si l'utilisation de désinfectants (hypochlorite de sodium et peroxyde d'hydrogène) sous forme de mousses permet la décontamination des deux formes de résistance bactériennes que sont les spores et les biofilms. D'un point de vue académique, l'évaluation quantitative de l'efficacité de décontamination de ces mousses biocides avec deux désinfectants puissants et sur les deux

formes bactériennes résistantes (spores et biofilms) est le premier objectif du travail. Cette mesure de l'efficacité de décontamination nécessite la mise au point de protocoles expérimentaux représentatifs des différentes mises en œuvre possible de la mousse sur le terrain : en projection sur une surface horizontale, en talochage sur une surface verticale et en remplissage.

En second objectif, des expérimentations de cinétique de décontamination, ont été réalisées notamment sur l'utilisation en remplissage. Il s'agit de préciser l'ordre de la réaction contaminant/mousse qui est peu documenté dans la littérature et de préciser l'influence de la température. Dans une vision plus applicative, la thèse s'efforce aussi de dégager des recommandations pour les futurs utilisateurs de ces mousses sur les spores et les biofilms.

Les matériels utilisés et les protocoles expérimentaux mis au point pour cette étude sont décrits dans le chapitre suivant.

Matériels et méthodes

2. Matériels et méthodes

Ce chapitre présente le matériel et les différents protocoles permettant la réalisation de l'évaluation de l'efficacité de décontamination de nos mousses sur deux formes de résistance bactérienne : les spores et les biofilms.

2.1. Matériels

Cette partie présente le matériel de laboratoire utilisé lors des expérimentations. Les appareils spécifiques aux mesures de tensions et de microscopies sont détaillés dans la partie méthode conjointement à leur protocole d'utilisation.

2.1.1. Les souches bactériennes employées au cours de l'étude

2.1.1.1. Les spores

Au cours de cette étude deux souches de spores bactériennes commerciales ont été choisies pour les expérimentations :

- *Bacillus thuringiensis* (Bt) DSM 5815 (Leibniz-Institute DSMZ Co., Braunschweig, Allemagne) est une bactérie à Gram positif aérobic (Figure 10). Cette espèce a été choisie car ces spores sont considérées comme des simuli de *Bacillus anthracis* (Buhr, Young et al., 2012).

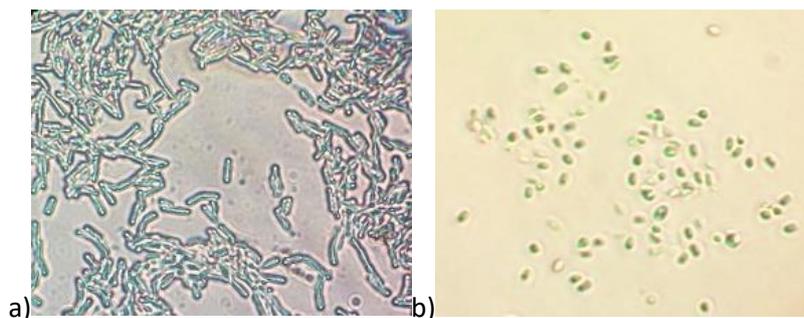


Figure 10. Bactéries de *Bacillus thuringiensis* ; a) forme végétative ; b) forme sporulée

- *Geobacillus stearothermophilus* (Gs) ATCC 7953 (Amilabo MesaLabs Company, Chassieu, France) est une bactérie à Gram positif utilisée comme contrôle lors des procédures de décontamination des laboratoires de type 3 (Wood, Choi et al., 2011). Cette espèce bactérienne est connue pour être résistante à la chaleur et avoir une température de croissance entre 55°C et 60°C (Doona, 2015).

2.1.1.2. Les bactéries végétatives

Pour l'étude menée avec des biofilms bactériens deux souches ont été testées :

- *Pseudomonas fluorescens* MF-37 (LMSM, Université de Rouen, France) est une bactérie à Gram négatif. Cette bactérie est très répandue dans le domaine de l'agroalimentaire car elle se développe de 0°C à 30°C et possède la capacité de former des biofilms (Simoes, Simoes et al., 2008). Elle est pourvue d'un flagelle et produit un pigment de la pyoverdine qui lui confère une fluorescence naturelle. Cette fluorescence naturelle permet d'observer ces bactéries sans avoir besoin de les marquer. De plus, les bactéries *Pseudomonas fluorescens* de notre étude ont été modifiées par électroporation d'un plasmide contenant le gène produisant le gène de la GFP pour augmenter sa capacité à fluorescer.
- *Pseudomonas aeruginosa* PA-14 ATCC 27853 (LMSM, Université de Rouen, France) est une bactérie Gram négatif largement répandue dans le domaine hospitalier. Elles sont responsables d'infections aiguës et/ou chroniques (Talwalkar and Murray, 2016). Cette bactérie est connue pour sa capacité à former des biofilms de plusieurs micromètres d'épaisseur en forme de « champignons ».

2.1.2. Formulation et génération des mousses biocides de l'étude

2.1.2.1. Formulation de la solution moussante

Les mousses de l'étude sont composées d'eau, d'un agent moussant, d'un agent épaississant et d'un désinfectant. L'agent moussant utilisé dans notre formulation est un tensioactif non ionique, Glucopon® 215 UP. Le Glucopon® 215 UP est composé de 36% d'eau et 64% d'alkyl polyglucoside. C'est un alkyl polyglucoside biodégradable et parmi l'un des meilleurs agents moussants (Figure 11).

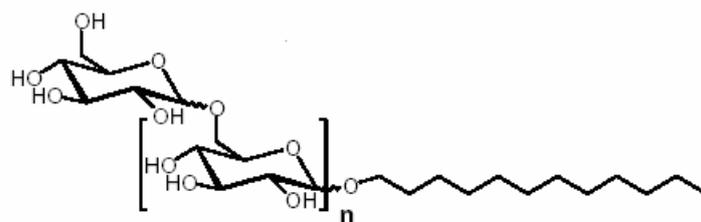


Figure 11. Structure chimique d'un Alkyl polyglucoside

L'agent épaississant est la gomme Xanthane. C'est un hétéropolysaccharide synthétisé par la bactérie *Xanthomonas campestris* (Simon, 2001) (Figure 12). Il est conditionné sous forme de poudre, puis préparé en solution liquide concentrée à 9 g/L.

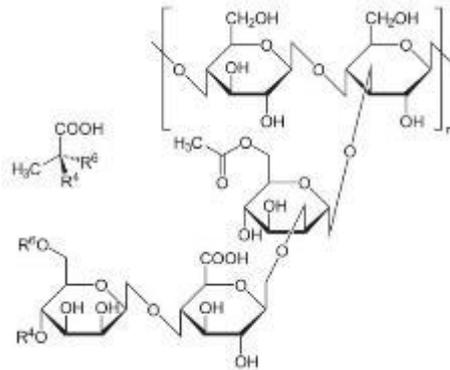


Figure 12. Structure chimique de la gomme Xanthane

Une fois en solution liquide sa conservation se fait à 4°C pendant une semaine maximum. Dans notre étude deux désinfectants ont été sélectionnés, l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène.

Trois types de mousses sont étudiés dans cette étude :

- Mousse neutre produite à partir d'une solution moussante composée de 11 g de Glucopon® 215 UP, 333 ml de solution de Xanthane à 9g/L et complétée jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Mousse H₂O₂ 12% produite à partir d'une solution moussante composée de 11 g de Glucopon® 215 UP, 333 ml de solution de Xanthane à 9g/L, 400 mL de solution H₂O₂ à 30% et complétée jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Mousse NaOCl 5% ou 2,5% produite à partir d'une solution moussante composée de 11 g de Glucopon® 215 UP, 333 ml de solution de Xanthane à 9 g/L, 357 mL ou 179 mL de solution NaOCl à 14% et complétée jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée.

2.1.2.2. Génération de la mousse

La génération de la mousse est réalisée grâce à un générateur statique à billes de Serv'instrument fourni par le Laboratoire des Procédés Supercritique et Décontamination du CEA de Marcoule (LPSD) (Figure 13).

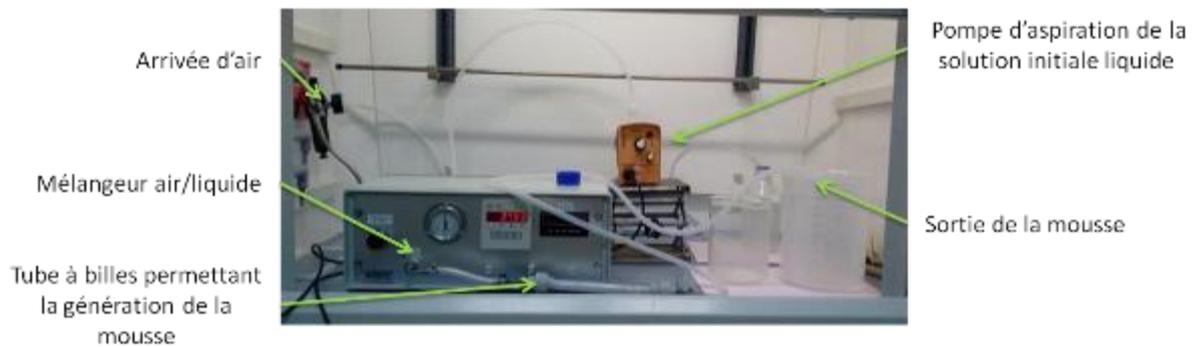


Figure 13. Image du générateur à mousse Serv'Instrument au laboratoire LPSD et Li2D.

La solution liquide est transférée dans le générateur par une pompe Pro-Instrument. La solution liquide est ensuite mélangée à de l'air (3 bars) en passant dans un tube contenant des billes en verre de 2 mm. L'air et le liquide sont contraints d'être mélangés dans les interstices des billes de verre (Figure 14).

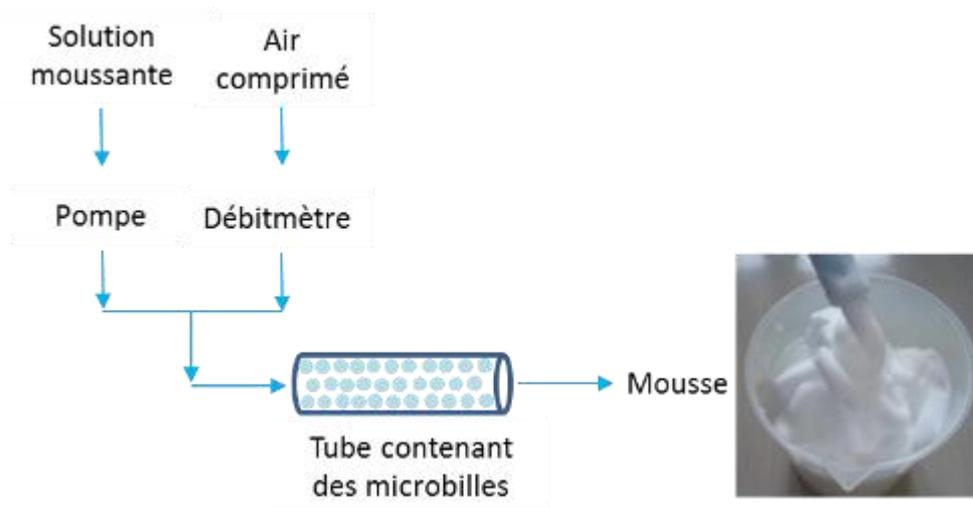


Figure 14. Schéma de fonctionnement du générateur à mousse

La fraction liquide de chaque mousse est contrôlée par le rapport des débits liquide et d'air et mesurée avant leur utilisation. Cette fraction liquide correspond au rapport entre le volume de liquide (V_L) dans la mousse et le volume de mousse (V_M). Le volume V_L est facilement déterminable car il correspond à la masse de la mousse pour un volume V_M (Malysa and Khristov, 1994). Ainsi, en utilisant la formule suivante, il est possible de calculer la fraction liquide des mousses en négligeant le poids de l'air :

$$\text{Fraction liquide en \%} = \frac{\text{Masse de la mousse (VL)}}{\text{Volume de mousse (VM)}} \times 100$$

Le générateur est paramétré afin d'obtenir une mousse avec une fraction liquide entre 5 et 6%. Le débit d'air du générateur est paramétré à 60 litres/heure (1 litre/min). Le débit de liquide de la pompe est adapté pour régler la fraction liquide de la mousse.

2.1.3. Inventaire des surfaces servant de support de test

Les supports utilisés pour cette étude sont les suivants :

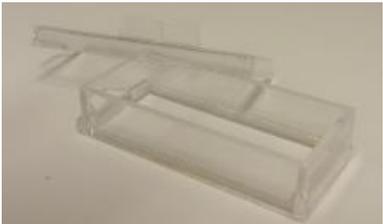
Polystyrène		
Contamination	Matériau	Stérilisation
Spores Biofilms	Lame de 2,5 cm sur 12 cm, tirée de boîte de Petri (petri dish polystyrene, Greiner Bio-one Co., Ltd, Frickenhausen, Allemagne)	Une nuit dans un bain de peroxyde d'hydrogène (ANIOS Co., Lille-Hellemmes, France), puis nettoyées avec de l'éthanol 70%. Stockage à 60°C
Verre		
Contamination	Matériau	Stérilisation
Spores	Lame en verre dépolie (Rogo Sampaic)	Autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Faïence		
Contamination	Matériau	Stérilisation
Spores	Carreau de faïence de type métro	Autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Aluminium		
Contamination	Matériau	Stérilisation
Spores	Lame en aluminium standard (DEM Groupe Fouré Lagadec, Laudun, France)	Autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Acier inoxydable		
Contamination	Matériau	Stérilisation
Spores Biofilms	Lame en acier inoxydable 304 L (DEM Groupe Foure Lagadec, Laudun, France)	Autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Mortier		
Contamination	Matériau	Stérilisation
Spores	Plaque de mortier redimensionnée (DEM Groupe Foure Lagadec, Laudun, France)	Autoclave à 121°C pendant 15 minutes

Lab-Tek® puits		
		
Contamination	Matériau	Stérilisation
Biofilms	Lab-Tek® à un ou deux puits détachables ou non, sur une lame en verre (borosilicate) (Thermo Scientific Nunc, Loughborough, UK) La surface de culture est de 8,6 cm ² .	Reçue stérile

Lab-Tek flask®

Contamination	Matériau	Stérilisation
Biofilms	Lab-Tek flask® comprenant un flacon sur une lame en verre (borosilicate) détachable (Thermo Scientific Nunc, Loughborough, Royaume-Uni) La surface de culture est de 9 cm ² .	Reçue stérile

Lamelle en verre

Contamination	Matériau	Stérilisation
Biofilms	Lamelle couvre objet pour microscope de 22 X 32 mm et de 0,3 mm d'épaisseur (Knittel Glass, Braunschweig, Allemagne)	Reçue stérile

2.1.4. Substances interférentes

Au cours des expérimentations, nous avons utilisé des substances interférentes. Afin de simuler une salissure par des nutriments ou du sang, nous avons réalisé les essais avec du Sérum d'Albumine Bovine (BSA), une protéine extraite du sérum bovin, lyophilisé à 3 g/L (Sigma Life Science). De plus, des essais ont été réalisés avec de l'huile de moteur et de l'argile verte surfine de type Montmorillonite (Laboratoires Gilbert, Hérouville Saint-Clair, France) à 5% diluée dans de l'eau distillée.

2.1.5. Substances neutralisantes

Pour arrêter l'action des désinfectants, des solutions neutralisantes ont été utilisées comme préconisé par *Russell* (1990). Pour inactiver le peroxyde d'hydrogène nous utilisons de la catalase à 40 mg/L dans du tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline PBS) 50 mM

NaCl 150 mM (pH 7,2) stérilisé par filtration avec un filtre 0,45 μm . La neutralisation de l'hypochlorite de sodium est réalisée avec une solution de thiosulfate de sodium à 10 g/L dans de l'eau distillée puis stérilisée à l'autoclave.

2.2. Méthodes

Cette partie présente les protocoles des expérimentations utilisés au cours de cette étude.

2.2.1. Techniques de culture

2.2.2.1. Production de spores

Les souches de spores bactériennes Bt et Gs ont été produites au Li2D à partir de solutions commerciales.

2.2.2.1.1. Production des spores de *Bacillus thuringiensis* :

Les spores de *B. thuringiensis* (Bt) ont été préparées en se basant sur le protocole utilisé pour *Bacillus cereus* décrit par Wood et al. (2015). Dans un premier temps une pré-culture est réalisée dans 10 mL de milieu LB liquide (LB, Becton Dickinson Co., Sparks, MD) en étuve à 30°C à 160 rpm à partir de spores congelées. Après une nuit, 150 µL de la pré-culture sont transférés dans du milieu LB frais et mis à incubation 5 heures à 30°C sous agitation à 160 rpm. De cette culture 200 µL sont déposés sur une gélose dans une boîte de Petri. Cette gélose est composée de 5g de Tryptone, 3g d'extrait de bœuf, 3g/L de NaCl, 20g/L d'agar, 0,1g/L de glucose, puis complétée avec 10 mL de solution métallique contenant 0,25 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,3g/L de $CaCl_2$, 0,4g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 40mg/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 25mg/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ et 25mg/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, puis le tout est ajusté à un pH 7 avant stérilisation. Les boîtes ensemencées sont ensuite filmées et mises en étuve à 30°C pendant la sporulation. La progression de la sporulation est vérifiée par microscopie optique à 7 et 9 jours après l'incubation. La récupération se fait lorsque le taux de spores visibles au microscope est supérieur à 95% des bactéries présentes. L'ensemble des cultures est alors récolté à l'aide d'un râteau et de l'eau distillée stérile. Une série de quatre lavages est ensuite réalisée par centrifugations et resuspensions avec de l'eau stérilisée (4500 tr/min à 4 ° C, deux fois 30 minutes, 20 minutes et 15 minutes). Ces lavages permettent d'éliminer les débris cellulaires et les co-contaminants des milieux. La suspension de spores est ensuite chauffée afin d'éliminer les cellules végétatives vivantes restantes. Les tubes contenant les spores sont placés dans un thermomixeur pendant 15 minutes à 70°C et sous agitation à 300 rpm. Ils sont ensuite immédiatement transférés dans de la glace pendant 20 minutes afin de créer un choc thermique. Enfin les tubes sont placés dans un bain de sonication à 45 Hz contenant de la

glace pendant 4 minutes afin de séparer les agrégats avant congélation. La concentration en spore des cultures est déterminée en exécutant une série de dilution à 1:10 et 1:5. Ces dilutions sont préparées sur boîte de Petri avec un milieu de LB agar et incubées à 30°C pendant une nuit. Le nombre de bactéries formant des colonies à la surface de la gélose est compté et rapporté en CFU (Colony Forming Unit). Les tubes de la culture contenant les spores sont stockés à -20°C avant leur dilution à la concentration 10⁸ spores/ml pour les essais.

2.2.2.1.2. Production des spores de *Geobacillus stearothermophilus* :

Les spores de *Geobacillus stearothermophilus* (Gs) ont été préparées suivant le protocole décrit par *Van Bokhorst-Van de Veen et al.* (2015). Pour la culture, une pointe de spores de Gs est transféré dans un milieu de culture liquide de type Bouillon Tryptone Soja (TSB) (Biomérieux). Après une nuit à 60°C et 150 rpm d'agitation, 1 mL de la culture est déposé sur des boîtes de Petri contenant une gélose. Cette gélose contient 3 g/L d'extrait de bœuf, 4 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de peptone, 0,51 g/L MgSO₄ 7H₂O, 0,97 g/L KCl, 0,2 g/L CaCl₂ 2H₂O, 3 mg/L MnCl₂ 4H₂O, 0,55 mg/L FeSO₄ 7H₂O, 12 g/L d'agar. Les boîtesensemencées sont ensuite filmées et placées en étuve à 60°C pendant la sporulation. La progression de la sporulation est vérifiée par microscopie optique à 10, 15 et 21 jours après la mise en étuve. Le pourcentage de spores visibles au microscope atteint seulement 70% après 3 semaines. Cependant, les géloses se desséchant la récupération des spores est quand même réalisée. Elle est faite à l'aide d'un râteau et de 15 mL eau distillée stérile par boîte de Petri. Une série de quatre lavages est ensuite réalisée par centrifugations et resuspensions avec de l'eau stérilisée (4500 tr/min à 4°C, deux fois 30 minutes, 20 minutes et 15 minutes). Après ces lavages une observation au microscope indique la présence de bactéries sous forme végétative inertes. La concentration en spore des cultures est déterminée en exécutant une série de dilution à 1:10 et 1:5. Ces dilutions sont préparées sur boîte de Petri avec un milieu de Tryptone Soja et Agar (TSA) et incubées à 60°C pendant 48h. Le nombre de bactéries formant des colonies à la surface de la gélose est compté et rapporté en CFU. Les tubes de la culture contenant les spores sont stockés à -20°C avant leur dilution à la concentration 10⁸ spores/ml pour les essais.

2.2.2.2. Production de biofilm

Lors de cette étude nous avons formé des biofilms à partir de deux souches de bactéries : *Pseudomonas aeruginosa* (PA-14) et *Pseudomonas fluorescens* (MF-37) (Figure 15).

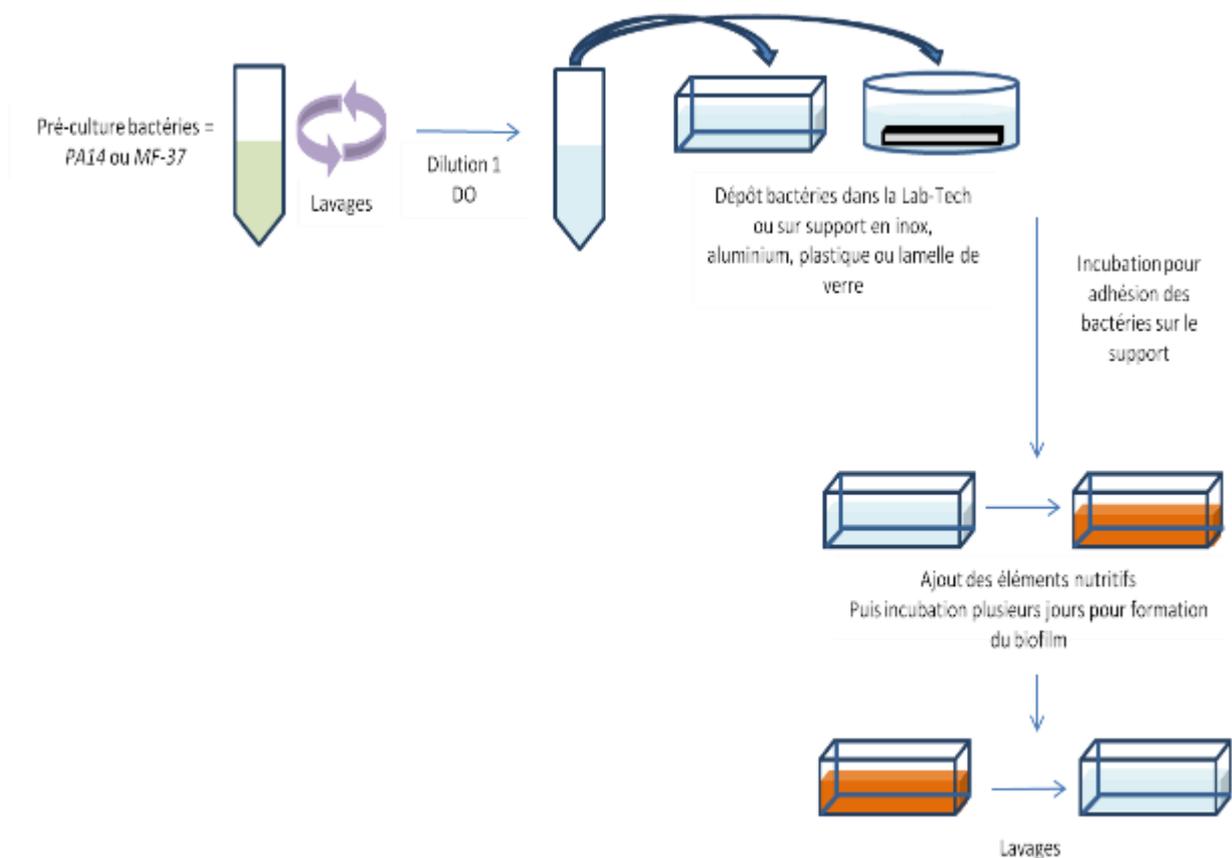


Figure 15. Schéma du protocole de formation des biofilms bactériens sur support

Pour ces deux bactéries le protocole de production de biofilm est le même. Il débute par une pré-culture où une pointe de bactéries congelées est introduite dans 10mL de milieu TSB liquide et mis à incuber pendant 16h à 37°C à 160 rpm. Une série de trois lavages est ensuite réalisée par centrifugations et remises en suspension avec du PBS stérilisé (7000 tr/min à 4°C pendant 10 minutes). La DO de la culture est ensuite mesurée à 600 nm. La culture est diluée avec du PBS (pH 7,2) afin d'obtenir une DO_{600} égale à 1 par mL ce qui permet d'utiliser pour chaque essai la même la quantité de bactéries. La culture diluée est déposée sur l'un des supports. Les lamelles en verre comme celles en polystyrène et en acier inoxydable, se trouvent posées au fond d'une boîte de Petri et les bactéries sont déposées dans la boîte afin de recouvrir entièrement les lames. Des essais ont aussi été réalisés avec des lamelles en verre insérées dans un Falcon® en position horizontale.

Le support contaminé est ensuite mis à incuber 2h à 37°C pour permettre l'adhésion des bactéries au support. Le liquide de culture est changé et le support est mis à incuber durant la formation du biofilm. Plusieurs paramètres ont été testés afin de déterminer le milieu, la température et le temps d'incubation les plus favorables à la formation du biofilm.

Ainsi, les milieux testés ont été du PBS, du TSB, du TSB dilué avec de l'eau distillée à 1/10^{ième} et du TSB dilué avec de l'eau distillée à 1/10^{ième} contenant 0,1% de Tween 80. Pour certains essais le milieu a été retiré après 24h et aucun autre produit n'a été ajouté pour les autres 24h d'incubation. Certains biofilms même ont été formés sans aucun milieu. L'incubation des biofilms a été testée à 37°C et 25°C, pendant 24h, 48h et 72h.

Après incubation, un lavage doux est effectué avec du PBS (pH 7,2) afin de retirer les bactéries sous forme planctonique. Trois techniques de lavage ont été testées. La première correspond à un lavage en bain où la lame avec le biofilm est trempée successivement dans deux bains de PBS (pH 7,2). La seconde est un lavage en flux où le PBS (pH 7,2) est versé doucement sur le support à l'aide d'une pipette. Enfin, pour les biofilms formés dans les Lab-Teks®, un lavage est directement réalisé en prélevant avec une pipette doucement le milieu qui y est contenu. Les biofilms sont maintenant prêts à être traités.

2.2.2. Protocole de décontamination des spores et des bactéries végétatives

Les expérimentations ont été réalisées dans différentes configurations afin d'évaluer au plus réaliste l'efficacité de décontamination des mousses sur les spores et les bactéries végétatives.

2.2.2.1. Evaluation de l'efficacité de décontamination en position horizontale

2.2.2.1.1. Supports (protocole H)

L'objectif de l'expérimentation suivante est de mesurer l'efficacité de décontamination du biocide sous forme de mousse dans le cas d'un support contaminé sur une de ces extrémités. Le support est placé horizontalement dans la mousse afin de simuler une contamination réelle des sols et des surfaces planes horizontales (Figure 16).

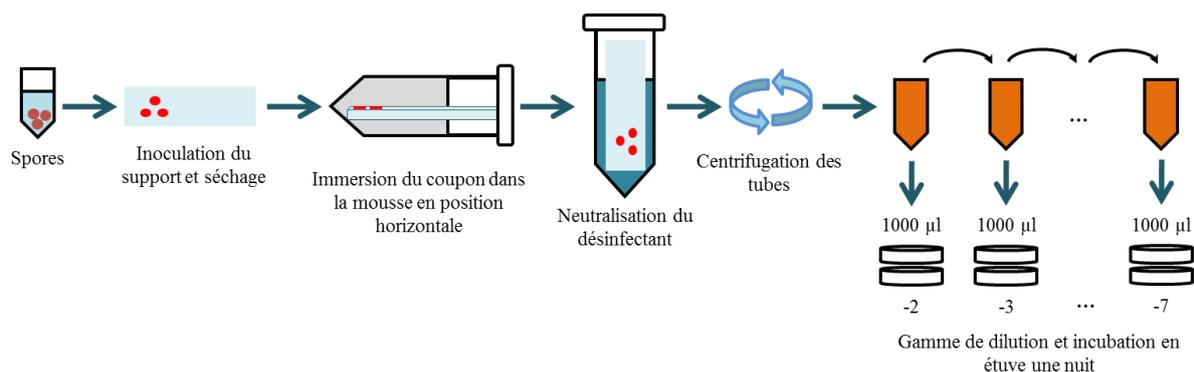


Figure 16. Schéma du protocole H de décontamination sur différents supports en position horizontale

Chaque support est contaminé avec une concentration de 10^8 CFU de spores de *B. thuringiensis* ou $2,7 \cdot 10^6$ spores de *Geob. stearothermophilus*. Pour cela, $100 \mu\text{L}$ d'une solution de spores de Bt à 10^9 CFU/ml ou de Gs à $2,7 \times 10^7$ spores/mL, sont déposés sur le support en deux lignes de 4 gouttelettes. Les supports sont ensuite mis à sécher à l'air sous une hotte jusqu'à évaporation du liquide (2 heures maximum avant utilisation). Ils sont ensuite immergés à l'horizontal dans un tube Falcon® contenant environ 25 ml de mousse à environ 5% de fraction liquide. Les Falcons® sont mis à incuber en position horizontale pendant 30 minutes à température ambiante (20°C) permettant l'action d'une couche de mousse d'environ 1,5 cm. Dans chaque Falcon® 20 mL de la solution neutralisante sont ajoutés suivant le désinfectant utilisé. Afin d'extraire et de changer le milieu, chaque tube est centrifugé à 4500 tr/min pendant 15 minutes à 4°C . Le surnageant est retiré et le culot contenant les spores est remis en suspension avec 10 mL de LB liquide. Les Falcons® sont ensuite placés en étuve à 30°C pendant 1 heure afin de détacher les spores restantes du support. Enfin, une gamme de dilutions est réalisée dans du milieu LB et $1,0 \text{ mL}$ de chaque dilution est déposé au fond d'une boîte de Petri puis recouvert de gélose LB agar. Après séchage, les boîtes de Petri sont filmées et mises en étuve pendant 18 à 24 heures à 30°C . Les colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU.

2.2.2.1.2. Substances interférentes (protocole H_{sali})

L'objectif de ces essais est de mesurer l'efficacité de décontamination du biocide sous forme de mousse dans le cas où un support contaminé par les spores est sali par des simulants de sang, d'huile et de terre. Avec ces simulants, nous avons mis au point différents protocoles d'essais suivant des scénarii de décontamination possibles. De l'albumine de sérum bovin

(BSA) a été utilisé pour simuler des taches de sang dans deux cas. Un cas post-accidentel où la contamination en spores se retrouve sous le sang (BSA) liquide ou séché. Ainsi qu'un cas où la contamination a été transférée sur du sang (BSA) séchée. Enfin, des essais avec de l'argile et de l'huile de moteur ont été réalisés afin de simuler la décontamination de véhicules et de matériel en extérieur en présence de spores. Le support est placé horizontalement dans la mousse afin de simuler une contamination réelle des sols et des surfaces planes horizontales (Figure 17).

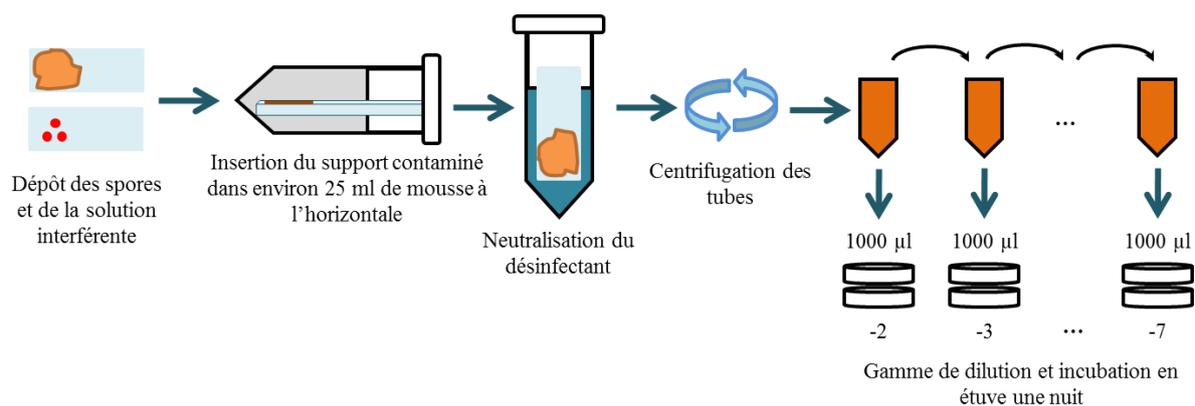


Figure 17. Schéma du protocole H_{sali} de décontamination avec une substance interférente en position horizontale

Une partie des supports en polystyrène est inoculée avec 100µL de spores de *B. thuringiensis* à une concentration de 10^9 CFU et une autre par 500µL de substance interférente. Après séchage, la contamination est recouverte avec 500µL de substance interférente et les substances interférentes par 100µL de spores de *B. thuringiensis* à une concentration de 10^9 CFU (Tableau 3). Les supports contaminés par les spores et les substances interférentes sont ensuite laissés à sécher sous la hotte durant 1h-1h30. Ils sont ensuite immergés dans un tube Falcon® contenant environ 25 mL de mousse et mis en contact avec la mousse en position horizontale, pendant 30 minutes ou 1 heure à température ambiante (20°C). Dans chaque Falcon® 20 mL de la solution neutralisante sont ajoutés suivant le désinfectant utilisé dans la mousse. Chaque tube est centrifugé à 4500 tr/min pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot contenant les spores sont remis en suspension avec 10 mL de LB liquide. Les Falcons® sont ensuite placés en étuve pendant 1 heure à 30°C. Enfin, une gamme de dilutions est réalisée dans du milieu LB et 1,0 mL de chaque dilution est déposé au fond d'une boîte de Petri puis recouvert de gélose LB agar. Après séchage, les boîtes de Petri sont filmées et mises en étuve pendant 18 à 24 heures à 30°C. Les

colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU.

Substance interférente	Premier dépôt sur le support	Second dépôt sur le support	Temps de contact mousse/contamination	
Huile	Spore puis séchage	Substance interférente puis séchage	30 minutes	
Argile	Spore puis séchage	Substance interférente puis séchage	30 minutes	
BSA 1%	Spore puis séchage	Substance interférente puis séchage	30 minutes	
			1 heure	
	Substance interférente puis séchage	Spore puis séchage	Laisser sous forme liquide	30 minutes
			30 minutes	
1 heure				

Tableau 3. Récapitulatif des configurations des essais de décontamination avec une substance interférente

2.2.2.2. Evaluation de l'efficacité de décontamination en position verticale (protocole V)

L'objectif de ces essais préliminaires est de mesurer l'efficacité de décontamination du biocide sous forme de mousse dans le cas d'un support vertical contaminé par des spores. Ces essais permettent de simuler une contamination réelle sur les murs et les surfaces verticales (écran, véhicules, ...). La couche de mousse talochée d'une épaisseur de 1 à 2 cm peut glisser le long du support et être récupérée à part. Les comptages de bactéries viables après l'application de la mousse sur le support sont réalisés à la fois dans la mousse récupérée après glissement et sur le support.

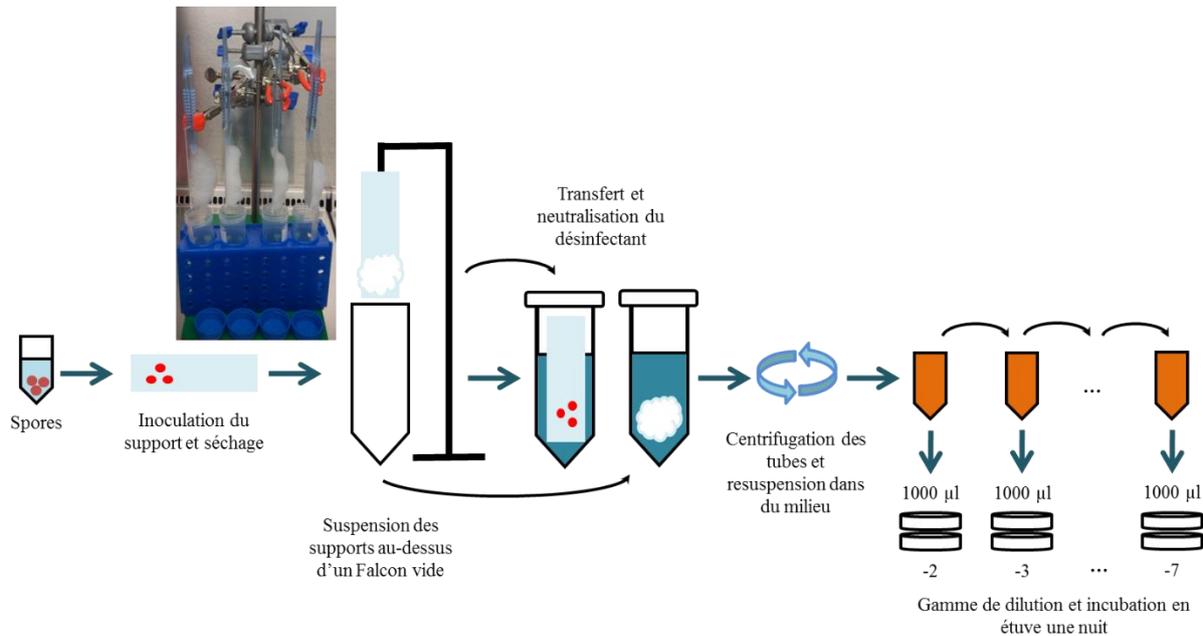


Figure 18. Schéma du protocole V de décontamination sur polystyrène avec des spores de *Bacillus thuringiensis* en position verticale

Des lames de polystyrène sont contaminées avec une concentration de 10^8 CFU de spores de *B. thuringiensis* en 100 µL d'une solution de spores à 10^9 CFU/mL (Figure 18). Les supports sont laissés à sécher sous une hotte environ 1 heure jusqu'à évaporation du liquide. Ils sont ensuite suspendus au-dessus de tubes Falcons® vides, par des pinces stériles raccordées à une potence. La mousse est déposée sur chaque support en position verticale. Il est nécessaire que la mousse lors du dépôt ne touche pas l'ouverture des Falcons®. Après 30 minutes de contact à température ambiante (20°C), les supports recouverts encore ou non de mousse, sont transférés dans des tubes Falcon® contenant 20 mL de la solution neutralisante. Dans les tubes sous les supports, où la mousse a pu glisser au cours de l'essai, sont ajoutés 20 mL de la solution neutralisante. Chaque tube est ensuite centrifugé à 4500 tr/min pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot contenant les spores est remis en suspension avec 10 mL de LB liquide. Les Falcons® contenant les supports sont placés en étuve à 30°C pendant 1 heure. Enfin, une gamme de dilutions est réalisée dans du milieu LB et 1,0 mL de chaque dilution est déposé au fond d'une boîte de Petri puis recouvert de gélose LB agar. Après séchage, les boîtes de Petri sont filmées et mises en étuve pendant 18 à 24 heures à 30°C. Les colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU.

2.2.2.3. Evaluation de l'efficacité de décontamination et sa cinétique en remplissage

La mousse peut être employée afin de décontaminer des installations de grands volumes (bureaux, wagons, systèmes d'aération, ...), ce qui englobe toutes les surfaces horizontales, obliques et verticales. Cependant, pour garantir 7 logs de réduction de spores, le temps de contact entre la mousse et la contamination doit être adapté en fonction de la position de la surface. En effet, sur une surface horizontale le mouillage est facilité par l'accumulation de liquide et donc de désinfectant en contact avec la surface. De fait, nous devons savoir si la cinétique de réaction est modifiée par le changement de position du support pour pouvoir adapter le temps de l'opération de décontamination.

2.2.2.3.1. Sans support (protocole $R_{\text{injectées}}$)

L'objectif de ces essais est d'injecter directement les spores libres dans la mousse ou la solution liquide afin de simuler une contamination de l'air d'une pièce par l'aérosolisation des spores.

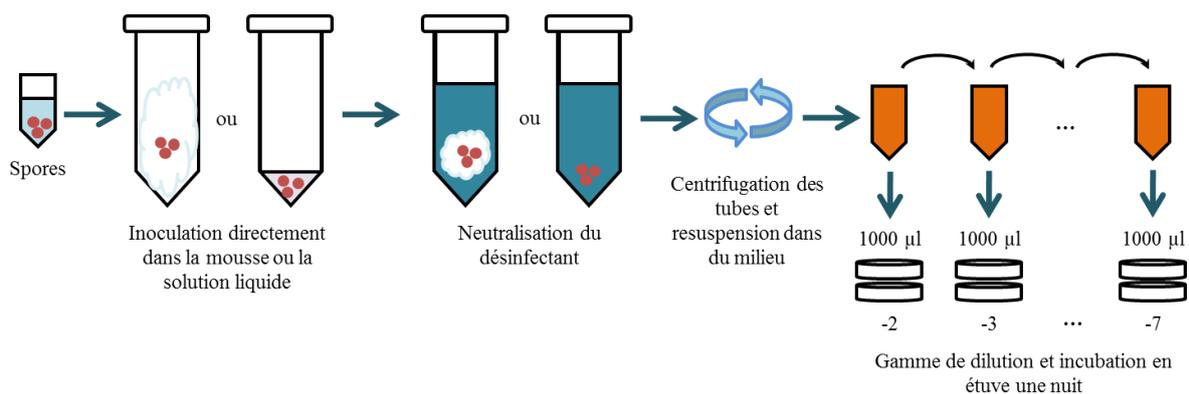


Figure 19. Schéma du protocole $R_{\text{injectées}}$ de décontamination des spores de *Bacillus thuringiensis* déposées directement dans la mousse ou la solution liquide à 20°C

Dans un tube Falcon® sont insérés 20 mL de mousse ou 1 mL de solution liquide contenant ou non un désinfectant (Figure 19). Ensuite, un volume de 100 µL de spores de *B. thuringiensis* à 10⁹ CFU/mL est déposé au sein de cette mousse ou solution liquide. Après un temps de contact de 10, 20 ou 30 minutes, une quantité de 30 à 40 mL de la solution neutralisante est introduite dans les Falcons®. Chaque tube est ensuite centrifugé à 4500 tr/min pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot contenant les spores est remis en suspension avec 10 mL de LB liquide. Enfin, une gamme de dilutions est réalisée dans du milieu LB et 1,0 mL de chaque dilution est déposé au fond d'une boîte de Petri puis

recouvert de gélose LB agar. Après séchage, les boîtes de Petri sont filmées et mises en étuve pendant 18 à 24 heures à 30°C. Les colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU.

2.2.2.3.2. Avec support à température ambiante, 4°C et 30°C (R_{support})

L'objectif est ici d'évaluer la cinétique de décontamination d'un support contaminé par des spores et immergé à la verticale dans la mousse ou la solution liquide. L'évaluation de la cinétique de décontamination a été réalisée à 20°C. De plus, des essais avec un temps de contact de 25 minutes ont été faits suivant le même protocole mais à 4°C et 30°C.

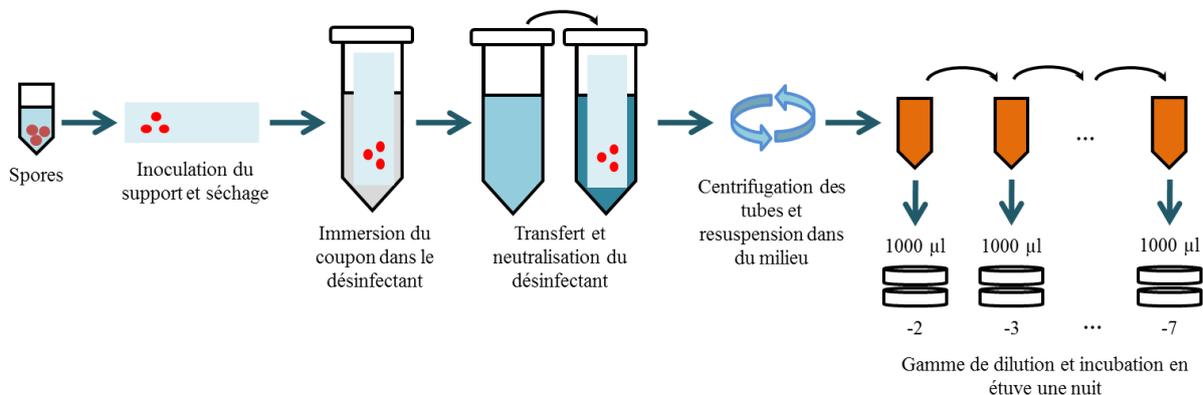


Figure 20. Schéma du protocole R_{support} de décontamination sur polystyrène avec des spores de *Bacillus thuringiensis* en remplissage avec le support à la verticale

Des supports en polystyrène sont contaminés avec une concentration de 10^8 CFU de spores de *B. thuringiensis* grâce au dépôt de 100 µL d'une solution de spores de Bt à 10^9 CFU/mL en deux lignes de 4 gouttelettes (Figure 20). Les coupons sont ensuite mis à sécher à l'air ambiant sous une hotte jusqu'à évaporation du liquide pendant environ 1h. Les coupons sont immergés dans un tube Falcon® contenant environ 20-25 mL de mousse. Les Falcons® contenant la mousse et les supports sont positionnés à la verticale pendant 5, 10, 15, 20, 25, 35 ou 45 minutes. Durant ce temps de contact, les tubes sont soit laissés sous la hotte à température ambiante, soit placés dans un frigo à 4°C pour simuler un refroidissement ou dans une étuve à 30°C pour simuler un réchauffement. Les supports sont ensuite transférés dans un tube Falcon® contenant 20 mL de solution neutralisante en essayant d'entraîner le moins de mousse possible avec le support. Dans les tubes Falcons® contenant seulement la mousse, 40 mL de la solution neutralisante sont ajoutés suivant le désinfectant utilisé. L'ensemble des tubes est ensuite centrifugé à 4500 tr/min pendant 15 minutes à 4°C. Les

surnageants sont retirés et les culots contenant les spores sont remis en suspension avec 10 mL de LB liquide. Les Falcons® contenant les supports sont ensuite placés en étuve à 30°C pendant 1 heure. Enfin, une gamme de dilutions est réalisée dans du milieu LB à partir de tous les tubes et 1,0 mL de chaque dilution est déposé au fond d'une boîte de Petri puis recouvert de gélose LB agar. Après séchage, les boîtes de Petri sont filmées et mises en étuve pendant 18 à 24 heures à 30°C. Les colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU.

2.2.1.3.3. Substances interférentes (protocole R_{sali})

Des expériences avec les substances interférentes ont aussi été réalisées en remplissage avec le support en position verticale. Le protocole expérimental est le même que pour les essais du paragraphe 2.2.2.1.2, hormis la position des tubes Falcon® durant le temps de contact entre la mousse et la contamination qui est à la verticale. Ces expérimentations ont été réalisées avec comme substance interférente, la BSA séchée.

2.2.1.4. *Tableau récapitulatif des protocoles d'évaluation de l'efficacité de décontamination des spores et bactéries végétatives par les mousse ou solutions liquides*

L'ensemble des protocoles de l'évaluation de décontamination des spores est récapitulé dans le Tableau 4.

Protocole	Souche de bactéries	Support	Configuration de l'essai	Temps de contact	Température
H	Bt et Gs	Polystyrène, Faience, Aluminium, Acier inoxydable, Mortier et verre	Remplissage support horizontal	30 min	20°C
H_{sali}	Bt	Polystyrène	Remplissage support horizontal avec substances interférentes	30 min ou 1 heure	20°C
V	Bt	Polystyrène	Vertical	30 min	20°C
R_{injectée}	Bt	Polystyrène	Remplissage sans support	10, 20 et 30 min	20°C
R_{support}	Bt	Polystyrène	Remplissage support vertical	5, 10, 15, 20, 25, 35 et 45 min	4°C, 20°C et 30°C
R_{sali}	Bt	Polystyrène	Remplissage support vertical avec substances interférentes	30 min ou 1 heure	20°C

Tableau 4. Récapitulatif des protocoles d'évaluation de l'efficacité de décontamination des spores par les mousses ou solutions liquides

2.2.4. Protocole d'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses sur des biofilms bactériens

L'objectif de cette étude est de caractériser l'efficacité de décontamination des mousses ou solutions liquides et leurs impacts sur les biofilms et leur structure. Les biofilms une fois formés sont traités avec une mousse ou une solution liquide contenant ou non un des

deux désinfectants. Après un contact de 1h, 2h ou 4 heures, les biofilms peuvent être observés en microscopie ou détachés afin de compter les bactéries encore viables (Figure 21).

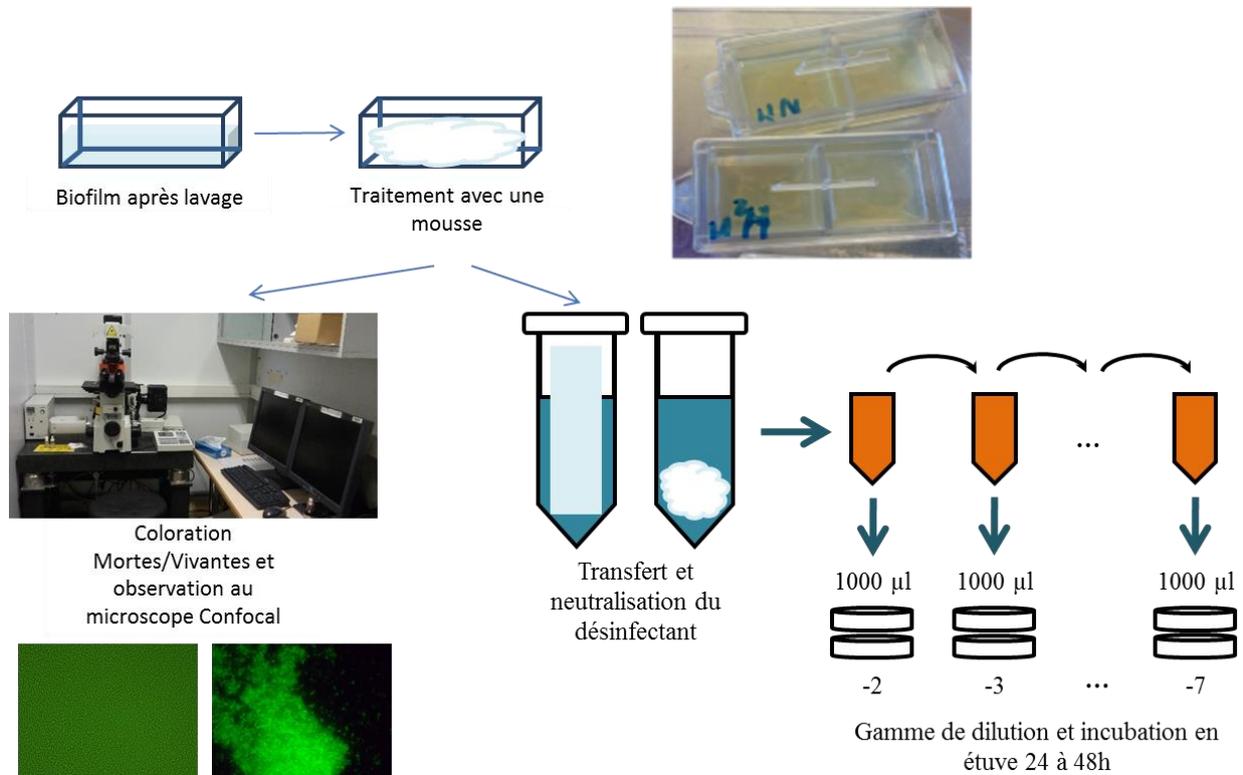


Figure 21. Schéma du protocole de décontamination des biofilms avec une photographie du microscope à fluorescence et confocal de Nikon au Li2D de Marcoule

2.2.4.1. Protocole de mesure de l'efficacité de décontamination par détachement et comptages des bactéries composant les biofilms

Après formation du biofilm suivant le protocole décrit en partie 2.2.1.2, les biofilms peuvent être récupérés pour dénombrer les bactéries encore viables après traitement par les mousses ou solutions liquides. Pour détacher les biofilms du support, deux techniques de récupération ont été expérimentées. La première est réalisée par sonication à 35Hz pendant 4 minutes avec du TSB à $1/10^{\text{ième}}$ + Tween 80 à 0,1%. La seconde est l'utilisation d'un vortex pendant 2 minutes avec 3g de billes de 2mm de diamètre et du TSB à $1/10^{\text{ième}}$ + Tween 80 à 0,1%. Les biofilms décrochés sont ensuite déposés soit sur le fond d'une boîte de Petri puis recouverts de LB agar ou directement sur une gélose de LB agar préalablement coulée dans la boîte. La quantité de bactéries déposée et leur répartition sur la gélose de LB agar ont été déterminées à l'aide de plusieurs techniques. Ces techniques sont : le séchage de 1mL de la dilution sur du LB agar gélosé ; le séchage de 100 µL de la dilution sur du LB agar gélosé et le

séchage après étalement au râteau de 100 μ L de la dilution sur du LB agar gélosé. Enfin, les boîtes de Petri sont filmées et mises en étuve à 37°C pendant 24h. Les colonies sont ensuite dénombrées et rapportées en CFU/mL.

2.2.4.2. Protocole d'observation de l'efficacité de décontamination par la microscopie à fluorescence et confocale

Les biofilms qui ne sont pas utilisés pour le comptage sont observés en microscopie à fluorescence et confocale. Ces microscopes reposent sur la visualisation de composés cellulaires notamment bactériens, ayant la capacité d'émettre une fluorescence (Figure 22).

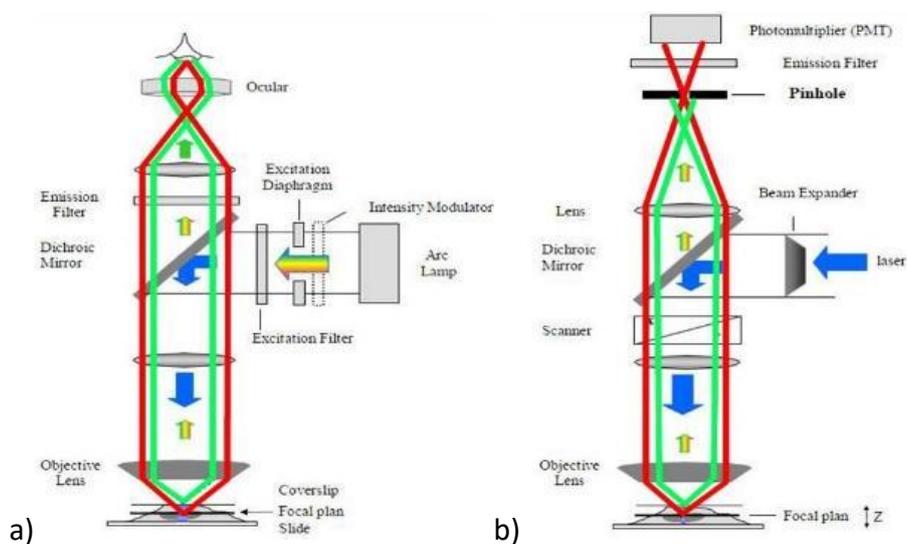


Figure 22. Schéma du fonctionnement de la microscopie : a) à fluorescence ; b) confocale

Ces composés vont pouvoir être excités par un laser à une longueur d'onde et émettre de l'énergie lumineuse sur une plage de longueurs d'ondes différente. La lumière émise est ensuite détectée par le microscope et permet d'obtenir des images cartographiant les cellules émettrices. Cette fluorescence peut être naturelle comme pour les bactéries d'espèce *Pseudomonas* grâce à la sécrétion de pyoverdine par ces bactéries (excitation 395 nm, émission 470 nm) (Schalk and Guillon, 2013). Cette production peut aussi être induite comme c'est le cas dans notre étude avec les bactéries MF-37 qui sont pourvues d'un plasmide contenant le gène produisant la « Green Fluorescent Protein » (GFP) une protéine fluorescente (excitation 475 nm, émission 504 nm). Enfin, il est possible d'utiliser des fluorochromes pour marquer spécifiquement les cellules ne produisant pas de fluorescence naturelle ou induite par un plasmide. Le marquage est réalisé par des fluorochromes possédant des capacités physico-chimiques leur permettant de se fixer préférentiellement sur

certaines molécules plutôt que d'autres ou de pouvoir pénétrer à travers certaines membranes. Pour nos essais, les bactéries sont marquées par deux fluorochromes, le Syto-9 et l'iodure de propidium afin de localiser dans l'espace du biofilm les bactéries mortes des vivantes. Ces fluorochromes se fixent sur l'acide nucléique dans les cellules (ADN et ARN). Le Syto-9 permet de marquer les bactéries vivantes en vert suivant les longueurs d'onde d'excitation/émission 485/498 nm pour l'ADN et 486/501 nm pour l'ARN. L'iodure de propidium est un contre-colorant de fluorescence rouge qui ne pénètre pas dans les cellules vivantes marquant seulement les bactéries mortes. Ce fluorochrome s'intercale entre les bases de l'ADN et permet leur observation suivant une longueur d'onde d'émission/excitation 533/617 nm. Ces fluorochromes sont présents dans le kit de coloration Live/Dead de BacLight (Invitrogen™). Le Syto-9 marque toutes les bactéries d'une population, que ce soit celles avec une membrane plasmique intacte ou endommagée. En revanche, l'iodure de propidium pénètre seulement dans les bactéries avec des membranes endommagées, entraînant une réduction de la fluorescence du SYTO 9 lorsque les deux colorants sont présents. Pour nos expérimentations, les biofilms ont été marqués par 1/1000 en Syto-9 et en iodure de propidium.

A partir de cette fluorescence naturelle ou induite, il est possible d'obtenir des images en microscopie à fluorescence et confocale. Les détecteurs du microscope captent la lumière émise après excitation des fluorochromes par le laser. Grâce à la microscopie à fluorescence, l'image obtenue est une cartographie en 2 dimensions des corps émettant la fluorescence sur un plan focal donnée en axe z. Par la microscopie confocale, il est possible d'avoir une image en 3 dimensions des cellules fluorescentes suivant un axe z pouvant faire plusieurs dizaines de μm . En effet, le plan focal de l'objectif va se positionner à différents niveaux de profondeur en axe z et réaliser une série de coupes. Ces coupes assemblées les unes sur les autres permettent d'obtenir une représentation tridimensionnelle de l'échantillon marqué.

2.3. Etude des propriétés physico-chimiques de la mousse

2.3.1. Etude de la mouillabilité

L'étude de l'angle de surface d'une goutte d'une solution moussante et de sa tension superficielle permettent de mieux caractériser les capacités de mouillage des mousses.

2.3.1.1. Etude de l'angle de contact d'une goutte posée sur une surface

L'angle de contact θ entre un support et une solution liquide est mesuré grâce à un tensiomètre à goutte posée (Figure 23).

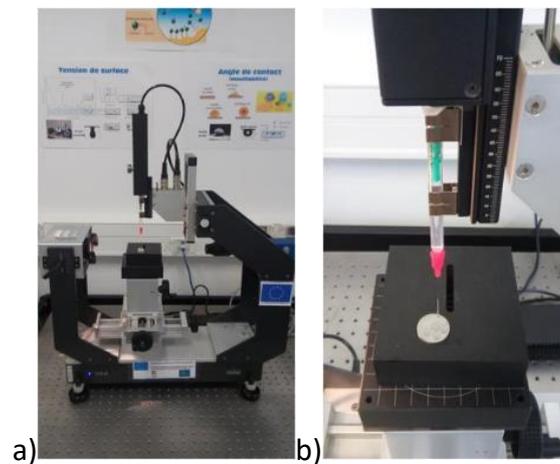


Figure 23. a) tensiomètre à goutte posée Krüss (DSA 30) au LMSM d'Evreux ; b) dépôt d'une goutte de solution liquide contenue dans la seringue sur un disque en acier inoxydable

La solution liquide est déposée goutte à goutte à l'aide d'une seringue sur une surface plane. Une caméra enregistre des images de la goutte au moment de son dépôt, permettant la mesure de l'angle que forme la goutte avec la surface. Cet angle permet de déterminer la capacité de mouillage de la surface par la solution liquide. Plus l'angle θ est faible plus la goutte s'étale à la surface et mouille la surface (Figure 24).

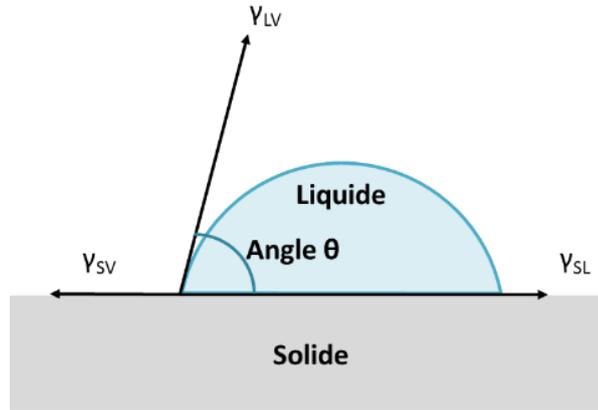


Figure 24. Schéma de mesure de l'angle θ entre un support et une goutte de solution liquide

La loi de Cassie considère qu'un liquide est hydrophobe si l'angle θ est compris entre 90° et 180° , c'est-à-dire que le liquide mouille mal la surface. Si l'angle θ est compris entre 10° et 90° , le liquide est hydrophile et il a donc la capacité de mouiller les surfaces. Cette notion de mouillage est indispensable à notre étude car les spores présentes sur une surface sont à dominante hydrophobe (Wiencek, Klapes et al. 1990). Ainsi, il nous faut savoir si le liquide décontaminant contenu dans la mousse mouille les spores déposées sur la surface.

La mesure de l'angle de contact θ a été réalisée pour les solutions moussantes NaOCl, H_2O_2 et neutre contenant du Xanthane. Les surfaces testées sont les mêmes que pour les essais d'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses avec les spores et les bactéries végétatives (2.2.2.1.1. Supports (protocole H)). Ces supports ont été préalablement nettoyés avec un puissant détergent (Amphospray 41) afin de retirer toutes traces de gras pouvant influencer les résultats. De plus, des essais ont été réalisés avec des lames en polystyrène salies avec de l'argile et de l'huile de moteur.

Deux solutions témoins ont été utilisées pour la conduite de ces essais. Ainsi nous avons mesuré l'angle θ de l'eau Volvic et d'une solution hydrophobe, l'hexadécane (Figure 25 et Figure 26).

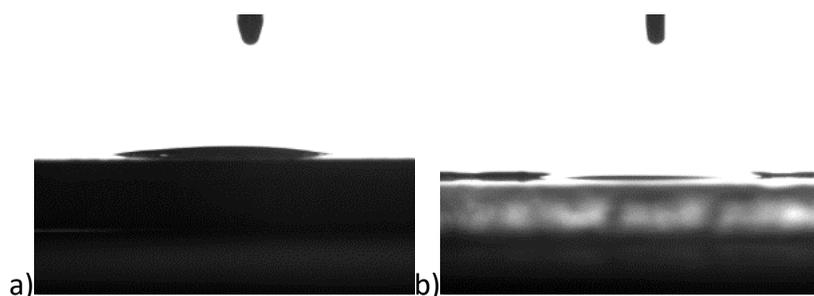


Figure 25. Dépôt de goutte d'hexadécane : a) sur une lame en acier inoxydable ; b) sur une lame en polystyrène

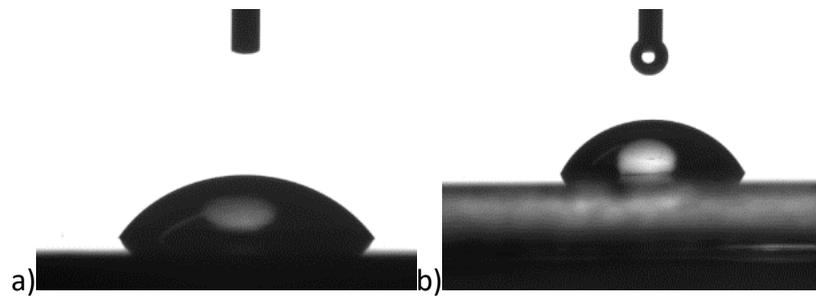


Figure 26. Dépôt de goutte d'eau Volvic : a) sur un carreau de faïence ; b) sur une lame en polystyrène

2.3.1.2. La tension superficielle de la solution

Afin de savoir si les additifs modifient la tension interfaciale, les tensions superficielles des additifs pris séparément et des solutions moussantes ont été mesurées grâce à un tensiomètre à anneau de Noüy (Figure 27).

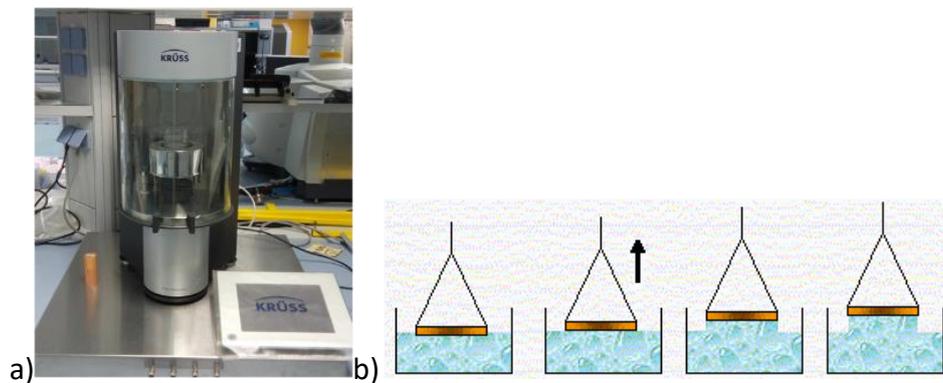


Figure 27. Tensiomètre à anneau de Noüy : a) image de tensiomètre Krüss du LPSD ; b) schéma de l'effet de la montée de l'anneau sur la surface du liquide (Schéma de l'Université du Québec à Chicoutimi)

Il permet de mesurer la tension superficielle à l'interface entre une solution liquide et l'air. La mesure de cette tension est possible grâce à un anneau de platine parfaitement plane qui est plongé dans le liquide. L'anneau est ensuite remonté jusqu'à sortir du liquide. La sortie de l'anneau du liquide est possible grâce à une certaine force qui est mesurée. Cette force F permet de déterminer la tension superficielle γ de la solution suivant la formule :

$$F = 2\pi \times (r_i + r_a) \times \gamma$$

Où r_i est le rayon intérieur de l'anneau et r_a son rayon extérieur. La tension superficielle de l'eau a été mesurée à 20°C et équivaut 71,3 mN/m.

2.3.2. Etude de la stabilité des mousses générées

La stabilité des mousses est étudiée en observant la fraction liquide contenue dans la mousse en fonction du temps, grâce au Foamscan du LPSD. En effet, cet appareil, commercialisé par la société Teclis®, est pourvu d'électrodes permettant de mesurer la conductance d'une mousse et d'en déterminer sa fraction liquide. La mousse générée à partir de notre générateur est déposée directement dans une colonne en verre équipée de 5 paires d'électrodes. Les électrodes vont mesurer la conductivité traversant la mousse toutes les 6 secondes. Ces mesures nous renseignent sur la fraction liquide globale de la mousse à chaque électrode en fonction du temps. Il est donc possible d'observer sur un graphique la vitesse du drainage de la mousse et s'il existe un retard au drainage. Dans notre étude, les courbes tirées de ces essais proviennent des électrodes jaunes à mi-hauteur de la colonne (Figure 28).

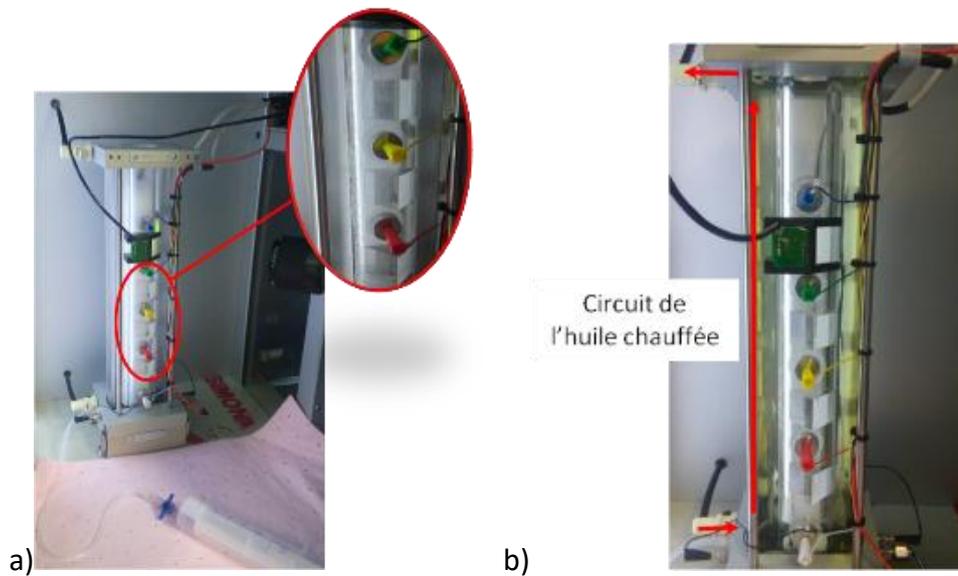


Figure 28. Colonne Foamscan du LPSD après insertion de la mousse : a) température ambiante ; b) avec une mousse à environ 32°C

La température mesurée lors de ces essais à température ambiante est de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. De plus, des essais avec une mousse à $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ont pu être réalisés grâce à un circuit d'huile chaude passant dans la colonne.

De plus, l'appareil est doté d'une caméra CSA photographiant un point précis de la colonne. Ces images permettent l'étude de la morphologie des bulles de la mousse comme leur taille (Figure 29).

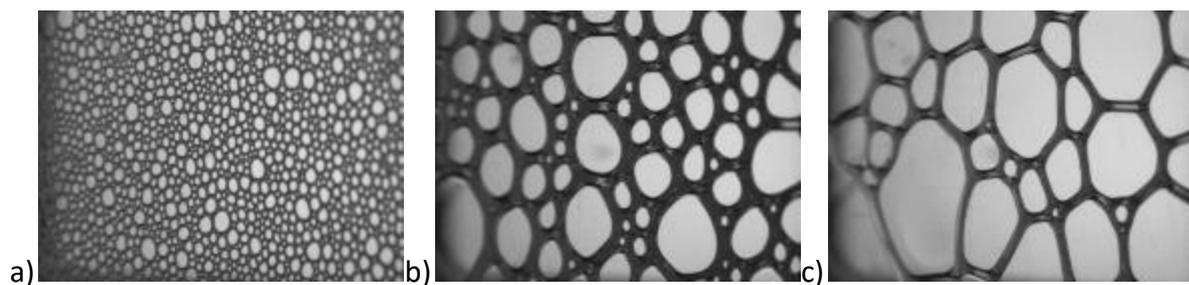


Figure 29. Exemple de photographie d'une mousse dans la colonne prise par la caméra CSA : a) 5 minutes après le commencement de l'essai ; b) après 109 minutes ; c) après 325 minutes

Dans notre étude, la caméra CSA est positionnée pour prendre en photo la mousse entre l'électrode verte et bleue donc dans la partie haute de la colonne.

2.4. Traitement statistique des données

2.4.1. Comptage des bactéries viables pour l'évaluation de l'efficacité de décontamination

L'ensemble des résultats de récupération et de réduction du nombre de bactéries est basé sur un minimum de trois répliques. De plus, chaque gamme de dilution a été préparée en double.

Les données de récupération ont été calculées pour chaque essai suivant l'équation ci-dessous:

$$\text{Récupération en \%} = [\text{CFU}_{\text{neutre}}/\text{CFU}_{\text{déposée}}] \times 100$$

Le $\text{CFU}_{\text{neutre}}$ correspond au nombre moyen de colonies comptées à partir des résultats des essais réalisés avec une mousse neutre, et $\text{CFU}_{\text{déposée}}$ est la quantité de spores déposées sur les supports ou dans la mousse/solution liquide au début des essais.

L'efficacité de la décontamination des mousses et des solutions liquides biocides a été calculée en réduction de log (LR). La réduction du nombre de bactéries ou de spores en log correspond au rapport des colonies viables après traitement neutre ($\text{CFU}_{\text{neutre}}$) par rapport aux colonies viables après traitement biocide (1) :

$$\text{Réduction en log} = \log(\text{CFU}_{\text{neutre}}/\text{CFU}_t) \quad (1)$$

CFU_t correspond au nombre moyen d'organismes viables récupérés après traitement de la contamination par des mousses ou des solutions liquides biocides. Pour chacun moyenne de CFU les écarts-types ont été calculés.

Des tests t de Student ont été réalisés en utilisant le logiciel XLStat (Addinsoft, Paris, France) afin de déterminer si deux ensembles de moyennes sont significativement différents les uns des autres. Pour cela, nous avons calculé la p-value entre les deux jeux de données. Nous considérons une différence significative entre eux si la p-value est $< 0,05$.

2.4.2. Détermination de la constante d'inactivation et de la loi d'Arrhenius

Sur des durées de 25 minutes, nous souhaitons évaluer les effets d'un refroidissement ou d'un réchauffement sur l'efficacité de décontamination des mousses. Nous avons d'abord déterminé la constante de vitesse d'inactivation k selon un modèle mathématique basé sur la cinétique du premier ordre:

$$dN/dt = -kN, \text{ ou dans la forme d'intégration, } \log (N/N_0) = -kt \text{ (2)}$$

Où N_0 est CFU_{neutre} et N est CFU_t à l'instant t (y compris le temps zéro). La pente de la régression linéaire de $\log(N/N_0)$ en fonction du temps t est égale à $-k$. Dans l'équation d'Arrhenius, k est lié à l'énergie d'inactivation E_a ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) (*Watanabe, Furukawa et al.*, 2003) par l'équation:

$$k = A_0 e^{(-E_a/RT)}, \text{ ou dans la forme d'intégration, } \ln k = \ln A_0 - (E_a/RT) \text{ (3)}$$

La constante de vitesse pour l'inactivation k est une fonction de la température T . A_0 est le facteur de fréquence et R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). Une courbe représentant la réduction du nombre de spores en log en fonction du temps en minutes a été tracée pour chaque température finale (4°C et 30°C) afin de mesurer k . La pente de la régression linéaire de $\ln k$ par rapport à $1/T$ permet de valider si une mousse suit la loi d'Arrhenius.

Résultats et discussions

3. Résultats et discussions

3.1. Etude des mécanismes d'action biocide des mousses sur les spores bactériennes suivant leurs différentes mises en œuvre

Cette partie de l'étude porte sur l'évaluation des mousses biocides sur les spores suivant les différents protocoles mis au point correspondant aux différentes mises en œuvre possibles sur le terrain. Le premier cas abordé dans cette étude est celui de la décontamination des surfaces horizontales par pulvérisation. C'est le cas le plus favorable à traiter.

3.1.1. Efficacité de décontamination des surfaces contaminées en position horizontale

3.1.1.1. Sur différents matériaux d'infrastructure (protocole H)

La mousse devant être utilisée pour décontaminer différentes infrastructures, il est intéressant d'évaluer sa capacité à décontaminer différents matériaux. Nous avons réalisé des essais avec différents matériaux horizontaux comme l'aluminium, le polystyrène, la faïence, le verre, l'acier inoxydable et le mortier. Ces matériaux ont été contaminés avec des spores de *Bacillus thuringiensis* (Bt) et *Geobacillus stearothermophilus* (Gs), puis traités avec les mousses pour déterminer leur efficacité de décontamination.

3.1.1.1.1. Critère de validation préalable du protocole expérimental

Dans un premier temps, nous avons déterminé la part de spores récupérées à la suite du protocole expérimental. Elle est mesurée par le nombre de spores comptabilisées à la fois sur le support et dans la mousse, suite au traitement par une mousse neutre (sans désinfectant). Cette part permet également d'évaluer la quantité de spores dont l'adhésion est faible sur le matériel expérimental. Cette valeur est prise en compte lors du calcul de l'efficacité de décontamination des mousses (CFU_{neutre} dans l'équation de LR (1)).

Une étude considère que cette fraction de spores récupérée doit être supérieure ou égale à 10% (Rastogi, Smith et al., 2013). D'autres, au contraire, acceptent une récupération pouvant être inférieure à 10% suivant le matériau testé (Edmonds, Sabol et al., 2014). Ces études mettent en évidence la difficulté d'évaluer la récupération de la totalité des spores au cours du protocole car celles-ci de nature hydrophobes adhèrent aux outils expérimentaux notamment avec des surfaces plutôt hydrophiles. Dans notre étude, la quantité initiale de

spores déposée sur le support est de 10^8 spores. Elle permet d'assurer une récupération minimale de 10^7 spores à la fin de l'essai quel que soit le matériau. Cependant, les différentes cultures de spores de Gs n'ont pas permises d'atteindre une concentration au-dessus des $2,7 \times 10^7$ spores/mL. De fait, la quantité de spores de Gs initialement déposées au cours de ces essais est d'environ $2,7 \times 10^6$ spores.

En se focalisant sur les spores de Bt, les résultats obtenus lors des essais sur les différents matériaux montrent que la récupération atteint 31% pour l'aluminium, 33% pour le polystyrène, 22% pour le carreau de faïence, 21% pour le verre, 28% pour l'acier inoxydable et 15% pour le mortier (Figure 30).

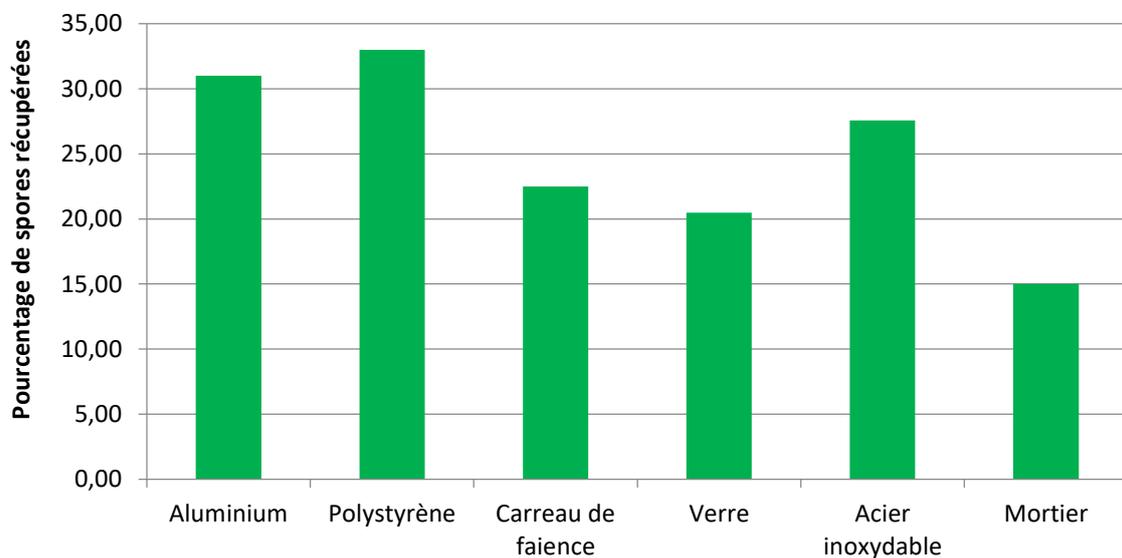


Figure 30. Pourcentage de récupération après traitement des spores de Bt sur différents matériaux par la mousse neutre

Il est connu que la récupération sur les matériaux poreux comme le mortier, est toujours plus basse. En effet, ce matériau étant poreux les spores sont plus difficiles à extraire (Rogers, Sabourin et al., 2005). Cependant, les pourcentages de récupération de nos essais restent toujours supérieurs à 10% et valident la bonne conduite de nos essais.

3.1.1.1.1. Tests d'efficacité de décontamination des mousses biocides en 30 minutes

- Evaluation de l'efficacité de décontamination sur les spores de Bt :

Des essais d'efficacité de décontamination des mousses NaOCl à 5% et H₂O₂ à 12% et d'une fraction liquide de $5,7 \pm 0,8\%$, ont été réalisés sur les différents matériaux en position

horizontale (aluminium, polystyrène, faïence, verre, acier inoxydable et mortier). Ces matériaux ont été contaminés avec des spores de Bt et Gs et mis en contact avec la mousse pendant 30 minutes. Il faut noter que les mousses utilisées lors des essais avec les spores Bt contiennent 3g/L de Xanthane et 1,5 g/L pour celles des essais avec les spores Gs.

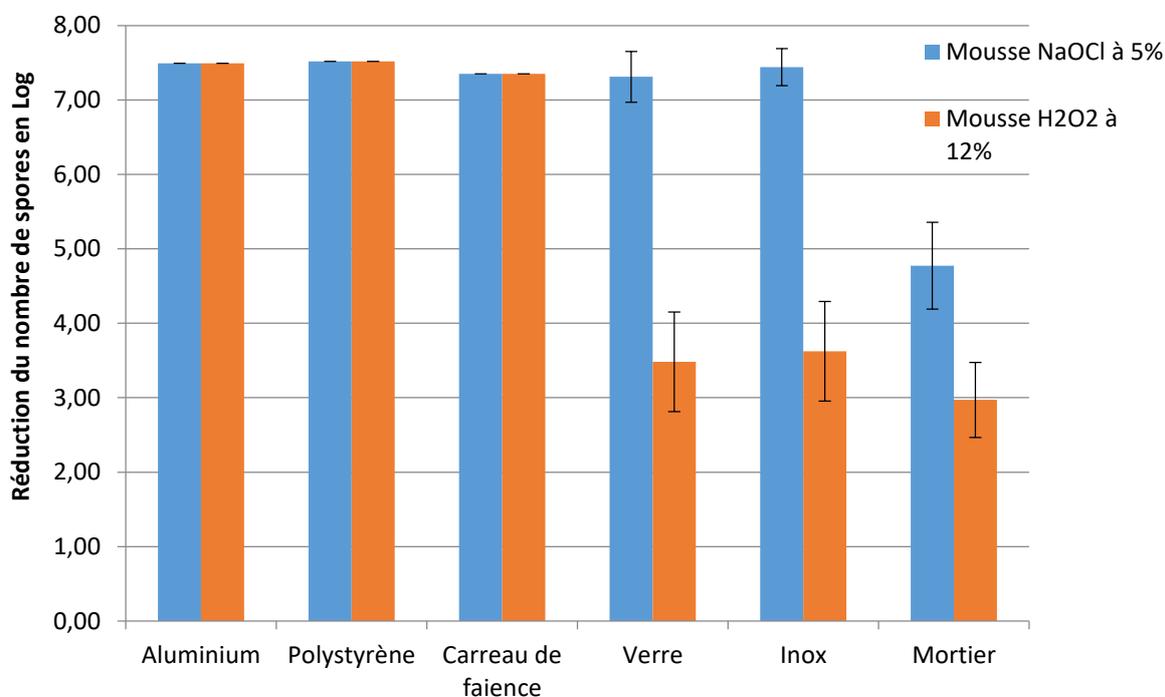


Figure 31. Efficacité de décontamination des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% de 5,7% de fraction liquide et contenant 3 g/L de Xanthane, sur différents matériaux contaminés par des spores de *Bacillus thuringiensis* après 30 minutes d'action en position horizontale

Avec des spores de Bt (Figure 31), les résultats d'efficacité de décontamination par la mousse NaOCl montrent une élimination supérieure à 7 logs sur les cinq matériaux testés. En effet, aucune spore n'est présente après traitement. Le film de mouillage formé par la mousse sur le support est donc suffisamment recouvrant et stable pour recouvrir totalement les spores et les inactiver en 30 minutes. La couche de mousse d'environ 1,5 cm au-dessus de la contamination en spores, suffit à décontaminer 10⁷ spores en 30 minutes. La décontamination de ces matériaux par les mousses est donc très satisfaisante et rapide. Il est à noter la polyvalence de la mousse NaOCl permettant la décontamination totale (> 7 logs) de cinq matériaux sur six.

La mousse H₂O₂ est aussi entièrement efficace sur trois des cinq matériaux (aluminium, polystyrène et faïence) (>7 logs) en 30 minutes. Elle est par contre moins efficace que la

mousse NaOCl sur le verre et l'acier inoxydable. Sur le verre, la réduction du nombre de spores est de $3,48 \pm 0,67$ log avec la mousse H₂O₂ 12% et de $3,62 \pm 0,67$ log pour l'acier inoxydable. Cependant, ces résultats d'efficacité de décontamination sur le verre et l'acier inoxydable, présentent une grande disparité. En effet, la mousse H₂O₂ 12% a tout de même permis de décontaminer entièrement trois des neuf supports en verre testés et deux des neuf supports en acier inoxydable. Ces résultats semblent montrer que le temps de contact (30 minutes) et/ou la concentration en H₂O₂ (12%) ne sont pas suffisants pour décontaminer l'ensemble de ces supports. Néanmoins, il ne semble pas nécessaire de modifier de façon importante ces deux paramètres (temps de contact et concentration en H₂O₂) pour assurer la décontamination totale des supports en verre et en acier inoxydable.

Le seul matériau à ne pas être décontaminé totalement par les deux mousses est le mortier. En effet, nous constatons que la décontamination de ce support est de $4,77 \pm 0,58$ log pour la mousse NaOCl 5% et de $2,97 \pm 0,50$ log pour celle à H₂O₂ 12%.

Afin de compléter l'ensemble de ces résultats, des essais de caractérisation du mouillage des solutions moussantes H₂O₂ et NaOCl sur les matériaux ont été réalisés. La Figure 32 rapporte les différents angles θ mesurés sur tous les supports.

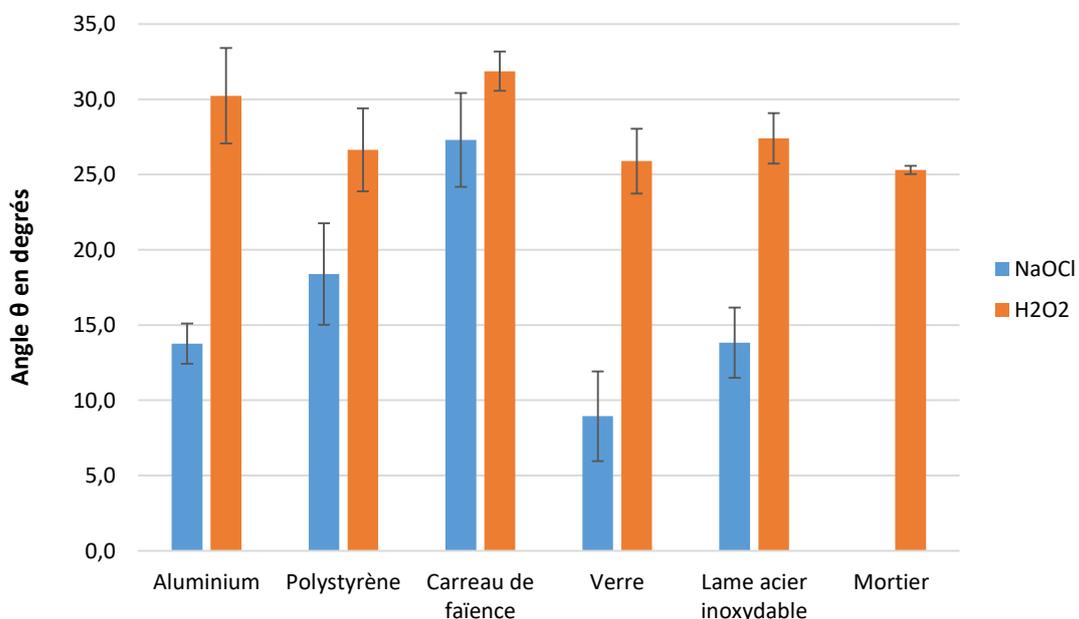


Figure 32. Angles θ en degrés observés entre la goutte posée et la surface du matériau pour les solutions moussantes liquides NaOCl 5% et H₂O₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane

Après mesure de l'angle θ sur tous les matériaux, la solution liquide NaOCl forme avec le support un angle θ bien moins élevé que pour la solution de H_2O_2 . Il existe une différence de mouillage entre les deux mousses sur les supports en verre et en acier inoxydable avec respectivement un angle θ de $8,9 \pm 3^\circ$ et $13,8 \pm 2,3^\circ$ pour la solution NaOCl et $25,9 \pm 2,1^\circ$ et $27,4 \pm 1,7^\circ$ pour la solution H_2O_2 . Cependant, les solutions sont toutes les deux mouillantes. La différence de mouillage entre les solutions liquides (maximum 15°) ne peut expliquer la meilleure efficacité en décontamination de la mousse NaOCl comparé à celle d' H_2O_2 .

Le film de mouillage se formant correctement sur la contamination, le biocide réagit immédiatement avec les spores permettant une décontamination rapide. Dans le cas d'application des mousses en position horizontale, le liquide drainé de la mousse s'accumule au cours du temps dans le film de mouillage et permet d'assurer une réserve en désinfectant (Figure 33).

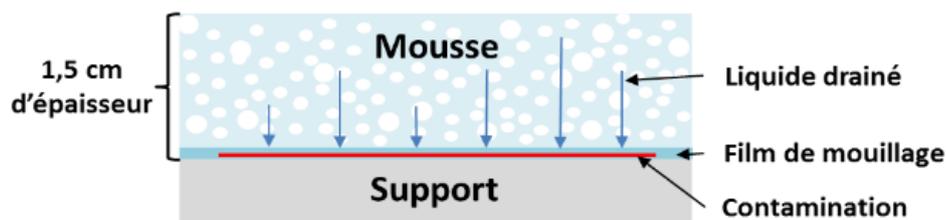


Figure 33. Schéma du mouillage d'un support en position horizontale par une mousse aqueuse

Pour le mortier, les gouttes de la solution NaOCl déposées sont immédiatement absorbées (angle $\theta = 0$), alors que pour la solution H_2O_2 l'angle est de $25,3 \pm 0,3^\circ$ et sont visibles à l'œil nu (Figure 34).

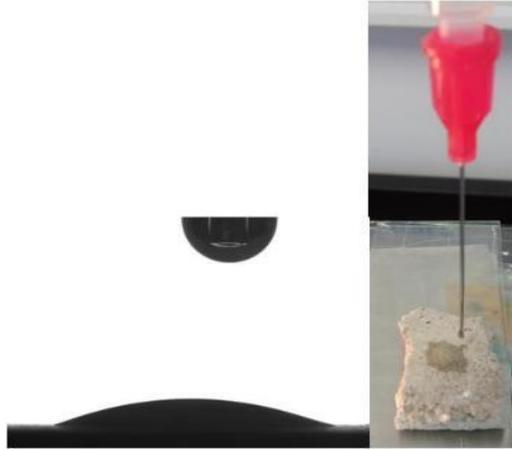


Figure 34. Goutte de la solution H_2O_2 sur support mortier

Cette difficulté de décontamination du mortier a déjà été décrite dans la littérature et peut être expliquée par la forte porosité de ce matériau (*Calfee and Wendling, 2012*). Etant très poreux, il est reconnu comme plus difficile à décontaminer car les spores se retrouvent logées dans les pores du support et peuvent être protégées du décontaminant (*Wood, Choi et al., 2011*). Ainsi, le film de mouillage de la mousse aurait plus de difficulté à se diffuser dans la porosité et à entrer en contact avec les spores les plus profondes dans les cavités, d'où la diminution de l'efficacité de décontamination du mortier.

En conclusion de ces essais sur les spores de Bt, la mousse NaOCl permet la décontamination de plus de 7 logs de l'ensemble des matériaux, hormis le mortier (réduction de 3 logs), en 30 minutes de contact en position horizontale. La mousse H_2O_2 permet la réduction de plus de 7 logs de spores sur l'aluminium, le polystyrène et la faïence. Le film de mouillage formé par les mousses sur ces matériaux est suffisamment stable et recouvrant pour permettre une décontamination rapide des spores (réduction de plus de 7 logs de spores en 30 minutes). Pour la mousse H_2O_2 , l'augmentation du temps de contact entre le film de mouillage de la mousse et la contamination permettrait peut-être la décontamination totale des supports en verre et en acier inoxydable. La différence d'efficacité entre les deux mousses ne peut être expliquée que par un meilleur mouillage des surfaces par la solution NaOCl. Ainsi, le temps de contact de 30 minutes ou la concentration en désinfectant H_2O_2 à 12% ne permet pas à la mousse H_2O_2 d'avoir une efficacité de décontamination équivalente à celle de la mousse NaOCl à 5%. Enfin, la décontamination du mortier par les deux mousses est partielle. Cependant, ce matériau est connu pour être difficile à décontaminer car les spores se logent dans les porosités et sont moins accessibles aux désinfectants.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination sur les spores de Gs :

En présence de spores de Gs, l'efficacité de décontamination des deux mousses a été évaluée avec les mêmes matériaux et dans les mêmes conditions que pour Bt (Figure 35).

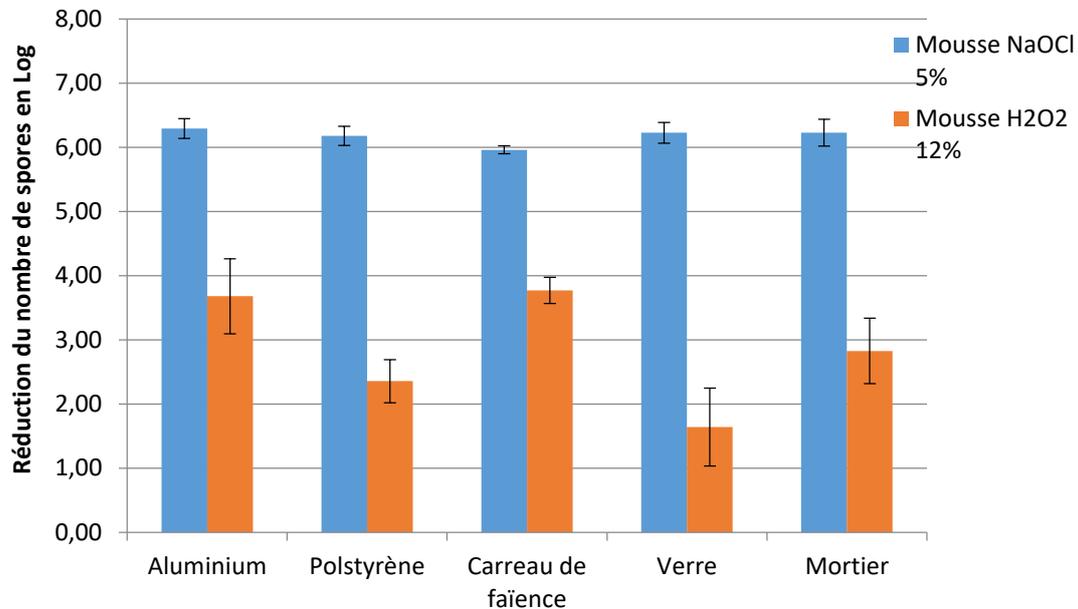


Figure 35. Efficacité de décontamination des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% sur différents matériaux contaminés par des spores de *Geobacillus stearothermophilus* après 30 minutes d'action en position horizontale

Après traitement avec la mousse NaOCl 5%, aucune colonie n'a été observée pour l'ensemble des matériaux testés. La mousse NaOCl 5% permet de décontaminer 6,83 ± 0,24 log de spores sur l'aluminium, 6,20 ± 0,15 log sur le polystyrène et de 5,96 ± 0,06 log sur le carreau de faïence. La mousse NaOCl est une nouvelle fois polyvalente car elle décontamine entièrement l'ensemble des matériaux.

Sur les mêmes matériaux, la mousse H₂O₂ ne permet pas d'atteindre une réduction de plus de 6 logs de spores de Gs. Cette mousse permet de réduire de seulement 4,22 ± 0,61 log le nombre de spores pour l'aluminium, 2,38 ± 0,34 log pour le polystyrène, 3,77 ± 0,20 log pour le carreau de faïence et 1,64 ± 0,61 pour le verre. La mousse H₂O₂ est donc plus efficace pour décontaminer les spores de Bt que celles de Gs. Des études ont justement démontré une plus grande résistance de *Geobacillus stearothermophilus* aux traitements H₂O₂ en

vaporisation en comparaison avec les spores de *Bacillus anthracis* et ses simulants (*Bacillus thuringiensis* et *Bacillus subtilis*) (Rogers, Sabourin et al., 2005, Sabbah, Springthorpe et al., 2010). De même, l'Agence de Protection Environnementale Américaine (EPA) a établi que les spores de Gs sont plus résistantes que celles de Ba et Bs sur une dizaine de matériaux (Rogers, Richter et al., 2006). Ainsi, la mousse H₂O₂ aurait plus de difficulté à décontaminer ces spores identifiées comme plus résistantes aux désinfectants.

Enfin, le mortier est totalement décontaminé par la mousse NaOCl (réduction de $6,82 \pm 0,32$ log de spores) par opposition aux résultats avec les spores de Bt. Des études ont montré que la résistance de certaines espèces de spores varie suivant le matériau utilisé (Rogers, Richter et al., 2006, Wood, Choi et al., 2011). Il est possible que l'adhésion des spores sur les matériaux varie suivant la souche bactérienne utilisée et leur hydrophobicité. L'hydrophobicité des spores peut être différente suivant les souches bactériennes et les traitements subis par les spores (forte températures) (Wiencek, Klapes et al., 1990). Cela pourrait expliquer la différence d'efficacité de décontamination entre les spores de Bt et Gs pour la mousse NaOCl. De plus, le nombre de spores de Gs déposées sur les supports est inférieur à celui en spores de Bt. Ainsi, la quantité en désinfectant nécessaire pour décontaminer la totalité des spores Bt déposées (10^8 spores) est donc supérieure à celle nécessaire pour décontaminer les spores de Gs ($2,7 \times 10^6$ spores). Il est possible que la quantité initiale de spores déposée impacte aussi l'efficacité de décontamination du mortier par la mousse NaOCl. Pour la mousse H₂O₂, aucune amélioration de la réduction du nombre de spores entre Bt et Gs sur le mortier n'est observable (p-value = 0,653). L'importante résistance des spores Gs à H₂O₂ ne permet pas d'observer une augmentation de l'efficacité de décontamination de cette mousse sur le mortier, même en diminuant le nombre initial de spores déposées.

Il faut noter une variation des résultats de mouillage des surfaces si celles-ci ont été nettoyées ou non par un détergent. Quelques mesures d'angle θ ont été réalisées avant le nettoyage des supports avec du TFD9. Ils mettent en évidence une différence de tension de surface due au nettoyage avec ce détergent. Par exemple, le verre une fois nettoyé au TFD9 passe d'un angle de contact d'en moyenne $19,8 \pm 1,9^\circ$ à $34,5 \pm 6,9^\circ$. L'utilisation de ce détergent pour supprimer toute trace de substances sur la surface du support augmente l'angle θ de la solution et donc diminue son mouillage. Il faut donc envisager dans notre travail

que la présence de substances à la surface des supports puisse modifier l'efficacité de décontamination des mousses.

En conclusion, la mousse NaOCl permet de décontaminer plus de 6 logs de spores de Gs en 30 minutes sur l'ensemble des matériaux utilisés, même sur le mortier. Le mouillage du mortier par la mousse NaOCl est donc suffisant pour décontaminer les $2,7 \times 10^6$ spores de Gs déposées. La mousse H₂O₂ par contre ne permet pas d'atteindre les 6 logs de réduction pour l'ensemble des matériaux. Les spores de Gs sont reconnues pour être plus difficiles à décontaminer par le peroxyde d'hydrogène que celles de Bt.

3.1.1.2. Substances interférentes (protocole H_{sali})

Les essais précédents ont permis de montrer que le mouillage du support semble avoir un rôle dans l'efficacité des mousses à neutraliser les spores. Cependant, il est très dépendant de la présence de substances sur le support. Il est donc important de savoir si certaines substances se retrouvant sur les surfaces peuvent interférer avec l'action des désinfectants (traces de sang, de terre ou d'huile). Pour le savoir nous avons évalué l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% sur des supports en polystyrènes, contaminés avec des spores de Bt et en présence de substances interférentes.

3.1.1.2.1. Impact de la présence de matière organique sur l'efficacité de décontamination :

Des essais ont été menés avec de la BSA (Bovin Serum Albumin, protéine du sérum bovin) séchée ou liquide afin de déterminer l'impact de la matière organique sur l'efficacité de décontamination sur les spores des deux mousses en 30 minutes de contact (Figure 36).

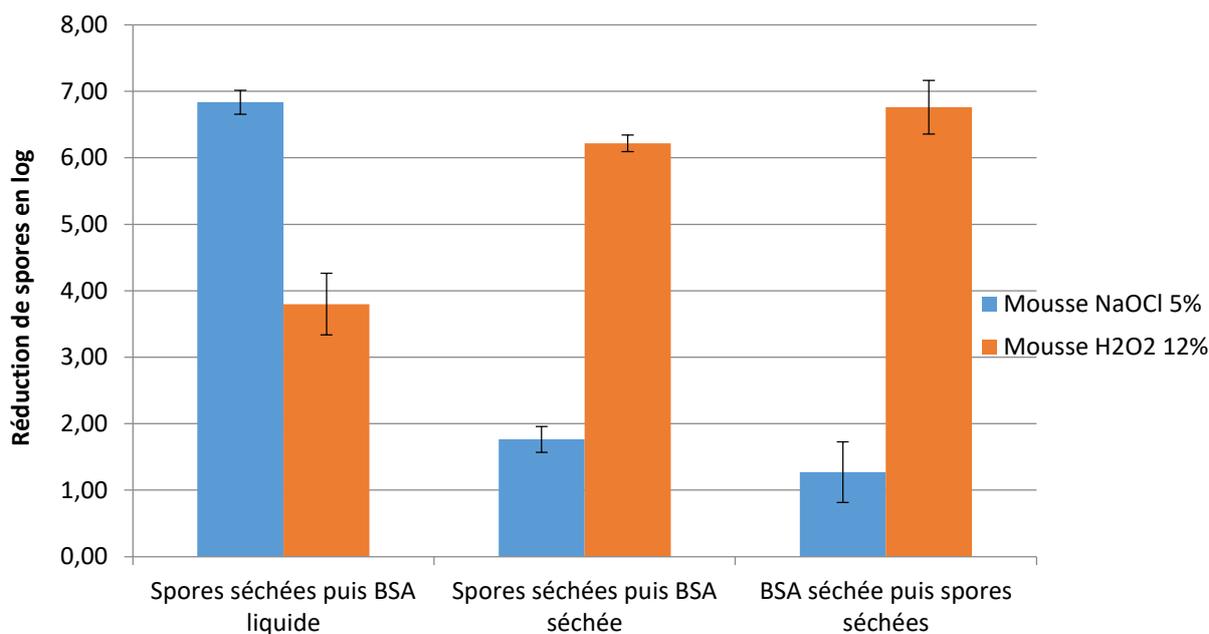


Figure 36. Efficacité de décontamination en réduction de log des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane en 30 minutes de contact, sur des supports en position horizontale contaminés par des spores de Bt et encrassés par de la BSA séchée ou liquide

La mousse NaOCl présente une action biocide quand la BSA est sous forme liquide. La décontamination se fait alors entièrement, ne laissant aucune bactérie viable après traitement (réduction de $6,84 \pm 0,18$ log de spores). Les résultats pour la mousse H₂O₂ sont à l'opposé de ceux de la mousse NaOCl. La mousse H₂O₂ décontamine partiellement la surface quand la BSA est sous forme liquide ($3,80 \pm 0,46$ log de réduction). L'étude de *Russotto et al.* (2017) décrit la matière organique comme ayant deux rôles sur la résistance des micro-organismes vis à vis des désinfectants. Le premier est un rôle direct, la matière organique forme une barrière protectrice entre la contamination et le biocide. Le second est un effet d'interférence de la matière organique sur certains désinfectants. Le désinfectant réagit avec la matière organique diminuant sa concentration et sa disponibilité pour décontaminer les micro-organismes. Dans le cas de la mousse H₂O₂, des études ont montré que ce décontaminant n'est pas ou peu affecté par la présence de matière organique (*Hilgren, Swanson et al., 2007*). Il est probable que son efficacité de décontamination soit amoindrie par la présence d'une barrière entre les spores et le film de mouillage. La BSA liquide engendrerait une barrière empêchant la formation d'un film de mouillage par la mousse H₂O₂ sur les spores. Cette hypothèse est appuyée par des essais réalisés suivant le même mode opératoire mais avec un temps de contact de 1 heure. Nous constatons que l'efficacité de

décontamination de la mousse H_2O_2 est la même après 30 minutes et 1 heure de contact (réduction de $3,35 \pm 0,31$ log de spores après 1 heure de contact et $3,80 \pm 0,46$ log après 30 minutes). La barrière formée par la BSA liquide entre la contamination et la mousse H_2O_2 reste intacte au cours du temps. Pour la mousse NaOCl cette barrière ne semble pas présente car la décontamination des supports se fait entièrement. Or dans la littérature il a déjà été décrit que NaOCl est inhibé par la présence de matière organique (*Bloomfield and Uso, 1985, Russell, 1990*). Il est donc possible qu'en réagissant avec les molécules de NaOCl, la structure des protéines soit modifiée et permettent le passage de NaOCl vers les spores. Cette action de NaOCl sur la barrière de protéines et les spores est rapide car elle se fait avant l'inhibition de l'ensemble du désinfectant présent dans la mousse par la BSA. La mousse NaOCl est donc plus efficace que la mousse H_2O_2 dans les cas de décontamination en présence de matière organique liquide.

Les mêmes essais avec de la BSA séchée montrent une décontamination par la mousse NaOCl de $1,76 \pm 0,20$ log et de $6,22 \pm 0,13$ log de spores pour la mousse H_2O_2 . L'hypochlorite de sodium en contact avec la matière organique séchée est cette fois consommé au détriment de son utilisation comme biocide. La BSA est concentrée sur les spores par évaporation du liquide lors du séchage. La présence de protéines devient alors trop importante et forme une barrière au contact de la contamination. Les molécules de NaOCl sont inhibées avant d'avoir un effet biocide sur les spores. A l'opposé, la mousse H_2O_2 entraîne la décontamination de l'ensemble des spores présente sous la BSA séchée. Ces essais en plus de valider l'inexistence d'activité interférente entre la matière organique et le H_2O_2 , permettent de mettre en évidence que la BSA séchée ne forme pas une barrière physique entre les spores et la mousse H_2O_2 . Le film de mouillage de la mousse H_2O_2 se forme correctement sur la BSA séchée sur les spores. Le désinfectant va alors pouvoir se diffuser entre les protéines pour atteindre les spores et les neutraliser. La mousse H_2O_2 est cette fois plus efficace que la mousse NaOCl dans les cas de décontamination en présence de matière organique séchée sur la contamination.

Enfin, quand les spores sont déposées sur de la BSA séchée, la mousse NaOCl permet de réduire de $1,27 \pm 0,46$ log le nombre de spores alors que la mousse H_2O_2 entraîne une réduction de $6,76 \pm 0,41$ log de spores. Pour la mousse NaOCl, ces résultats sont identiques à ceux où les spores sont sous la BSA séchée, malgré une disponibilité des spores accrue (p -value= 0,06). Les molécules de NaOCl semblent donc préférentiellement réagir avec la BSA

plutôt qu'avec les spores. Ce constat est appuyé par des essais réalisés dans les mêmes conditions expérimentales mais avec un temps de contact 1 heure. La mousse NaOCl permet une réduction de seulement $1,5 \pm 0,65$ log de spores. L'efficacité de décontamination de la mousse NaOCl est identique malgré un temps de contact doublé (p -value = 0,852). Il est donc possible que ce biocide ait entièrement réagi avec la matière organique, ne permettant pas la décontamination des spores. La réaction de NaOCl avec la matière organique est rapide (moins de 30 minutes) car l'efficacité de décontamination de la mousse est similaire à 30 minutes et 1 heure de contact. Pour la mousse H₂O₂ ces essais permettent de valider son efficacité sur les spores en présence de BSA en 30 minutes. Ainsi, la mousse H₂O₂ est de nouveau plus efficace que la mousse NaOCl en présence de matière organique séchée même si les spores sont plus disponibles car sur la salissure.

En conclusion, la mousse NaOCl permet la décontamination de 7 logs de spores de Bt en 30 minutes en présence de BSA liquide mais n'agit que très peu en présence de BSA séchée. A l'inverse, la mousse H₂O₂ permet d'atteindre en 30 minutes plus de 7 logs de décontamination en présence de BSA séchée mais pas quand elle est liquide. Il est possible que sous forme liquide la BSA diluée forme une barrière difficilement franchissable par le peroxyde d'hydrogène mais pas par l'hypochlorite de sodium. En présence de BSA séchée, la faible efficacité de la mousse NaOCl est due à l'inactivation de l'hypochlorite de sodium par la matière organique concentrée au niveau des spores lors du séchage. Cette inactivation du NaOCl par la matière organique est bien connue dans la littérature. Le peroxyde d'hydrogène n'étant pas inhibé par la BSA, le décontaminant va pouvoir atteindre les spores même si celles-ci sont présentes sous la matière organique séchée. Le film de mouillage de la mousse H₂O₂ est donc suffisamment recouvrant et stable pendant 30 minutes pour pouvoir apporter le désinfectant contenu dans la mousse sur les spores sous ou sur la couche de BSA séchée.

3.1.1.2.2. Impact de la présence d'huile de moteur et de matière minérale sur l'efficacité de décontamination

Afin de simuler la décontamination de véhicules et de matériels contaminés par des spores et présentant des salissures d'huile et de terre, nous avons réalisé des essais en présence d'huile de moteur et d'argile séchée (Figure 37).

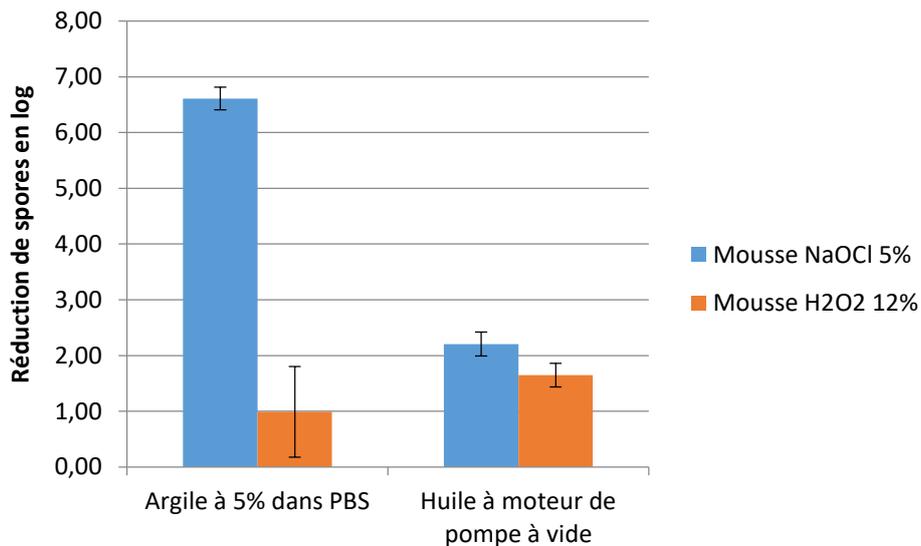


Figure 37. Efficacité de décontamination en réduction de log des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane en 30 minutes de contact, sur des supports en position horizontale contaminés par des spores de Bt et salis par de l'argile séchée ou de l'huile de moteur

Les résultats des essais avec une salissure à l'huile de moteur sont identiques pour les mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% (p-value = 0,078). Cette décontamination est de $2,20 \pm 0,21$ log pour la mousse NaOCl et $1,65 \pm 0,21$ log de spores pour celle à l'H₂O₂. Les résultats des essais avec l'huile de moteur montrent que cette substance forme une barrière entre les spores et la mousse. Aucune des deux mousses n'est capable d'amener suffisamment de désinfectant au contact des spores pour permettre leur décontamination totale. Comme le montre les photos de gouttes posées en Figure 38, les solutions déposées sur l'huile restent sur la surface et ne sont pas absorbées ni ne pénètrent à travers cette barrière. L'huile étant non miscible à l'eau, les mousses aqueuses forment un film de mouillage sur l'huile. Le biocide présent dans le film de mouillage peine à se diffuser à travers la barrière que forme l'huile et à atteindre en quantité suffisante les spores. L'huile de moteur forme donc une barrière difficile à traverser en l'état par les mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12%.

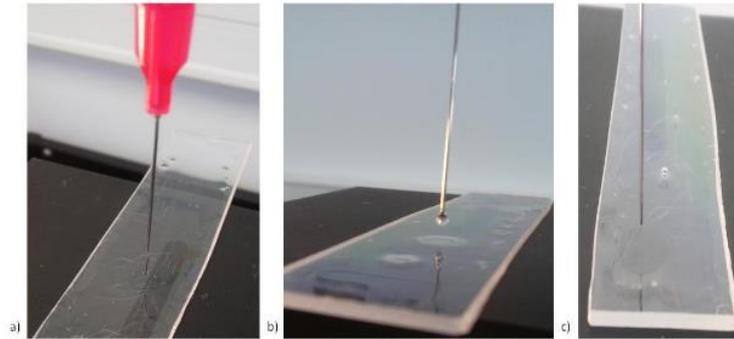


Figure 38. Goutte posée sur un support en polystyrène recouvert par de l'huile de moteur :
a) Solution Neutre ; b) Solution H₂O₂ ; c) Solution NaOCl

En présence d'argile la mousse NaOCl permet la décontamination de $6,61 \pm 0,20$ log de spores en 30 minutes de contact. La mousse H₂O₂ entraîne une réduction de seulement $0,99 \pm 0,81$ log de spores en présence de cette substance. L'argile en séchant se rétracte et forme une couche de matière minérale craquelée sur la surface du support (Figure 39).



Figure 39. Dépôt d'une goutte de la solution NaOCl sur de l'argile séchée sur un support en polystyrène.

Cependant en présence d'eau, l'argile sur le support devient visqueuse. Une forte augmentation de la quantité d'eau permet la dispersion des particules d'argile dans la phase liquide en formant une solution colloïdale. Le liquide provenant des mousses aqueuses et plus particulièrement du film de mouillage va entraîner l'hydratation de l'argile. Il est possible que cette hydratation par les mousses ne soit pas suffisante pour disperser les particules d'argile mais va plutôt créer une barrière faite d'argile visqueuse. Des études ont aussi montré que la matière organique sur des particules d'argile dans un milieu liquide est beaucoup plus vite

détruite par de l'hypochlorite de sodium que par le peroxyde d'hydrogène (*Lavkulich and Wiens, 1970, Siregar, Kleber et al., 2005*). De plus, le peroxyde d'hydrogène réagit avec les oxalates formant du calcium en laissant des résidus carbonés pouvant se complexer à la surface d'autres minéraux pour former des particules de plus grande taille, ce qui n'est pas le cas avec l'hypochlorite de sodium (*Mikutta, Kleber et al., 2005*). Ainsi, pour la mousse H₂O₂, la barrière d'argile hydratée et la présence de complexes minéraux de grande taille, empêche la diffusion du désinfectant jusqu'aux spores. Pour la mousse NaOCl il existe une diffusion rapide et suffisante du désinfectant jusqu'aux spores permettant leur neutralisation en 30 minutes.

En conclusion, seule la mousse NaOCl permet de décontaminer 7 logs de spores présentes sur de l'argile mais aucune des deux mousses n'entraînent la neutralisation de plus de 1 log de spores en présence d'huile de moteur. Il est donc nécessaire de procéder à un premier nettoyage avec un détergent capable de supprimer l'huile avant l'application des mousses et idem en présence d'argile avec la mousse H₂O₂. Malgré tout, avec un premier nettoyage simple et l'utilisation des mousses pour décontaminer, la quantité d'effluents resterait inférieure à celle générée par l'utilisation d'une solution liquide de décontamination.

3.1.2. Efficacité en position verticale (protocole V)

L'ensemble des essais réalisés en position horizontale ont permis de mettre en avant des caractéristiques propres à chaque mousse. Il est maintenant nécessaire d'observer le comportement des mousses sur une surface verticale ainsi que leur stabilité dans cette configuration particulière. En effet, les mousses de cette étude ont été développées afin de décontaminer des parois d'infrastructure par pulvérisation ou talochage. Leur utilisation sur des surfaces en position verticale peut alors avoir des conséquences néfastes sur leur efficacité de décontamination. Il est possible que les mousses ne restent pas suffisamment en contact avec la paroi verticale pour garantir la décontamination de 7 logs de spores en 30 minutes. Pour ces essais, les mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% sont donc directement appliquées sur un support en polystyrène suspendu à la verticale et mises en contact pendant 30 minutes avec des spores de Bt.

La récupération de spores lors des essais avec la mousse neutre est de $7,64 \pm 0,40$ logs sur les supports et de 7,52 logs dans la mousse récupérée après glissement. Cependant, seuls les essais avec des mousses contenant du Xanthane ont permis de distinguer la part de spores transférée dans la mousse de celle restée sur le support. En effet, les mousses ne contenant pas de Xanthane se sont toutes évaporées avant la fin de l'essai (30 minutes). Ces essais vont permettre d'observer l'efficacité de décontamination des mousses après le glissement de celle-ci le long du support ou après leur évaporation (Figure 40).

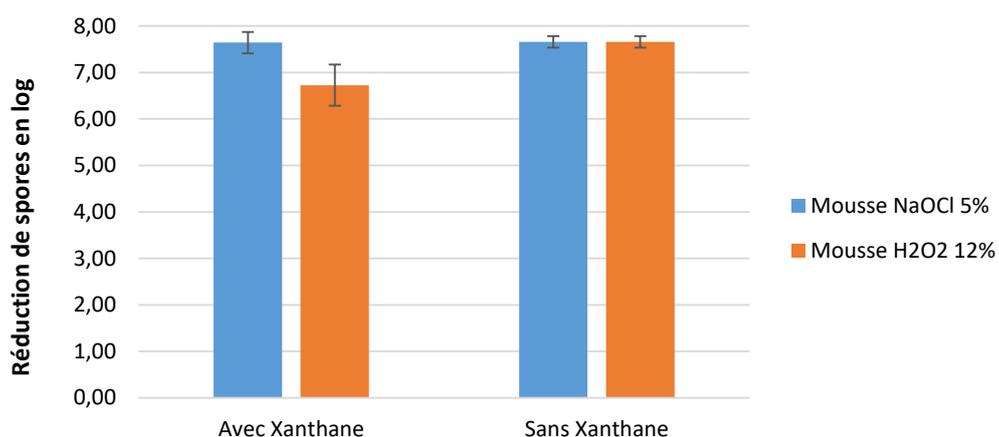


Figure 40. Réduction du nombre de spores sur un support en polystyrène en position verticale suite à un contact de 30 minutes avec les mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl et H₂O₂ contenant du Xanthane à 3 g/L :

La mousse NaOCl contenant du Xanthane permet la décontamination de l'ensemble des spores présentes sur le support ou transférées dans la mousse en 30 minutes. La mousse H₂O₂ contenant du Xanthane entraîne une réduction de $6,72 \pm 0,44$ logs de spores sur le support et de 7,52 logs dans la mousse. Cependant, l'utilisation de cette mousse a permis de décontaminer entièrement 3 supports sur les 4 contaminés.

Les mousses contenant du Xanthane glissent doucement (environ 1 cm/min) de la surface du support par gravitation (Figure 41 et Figure 42).

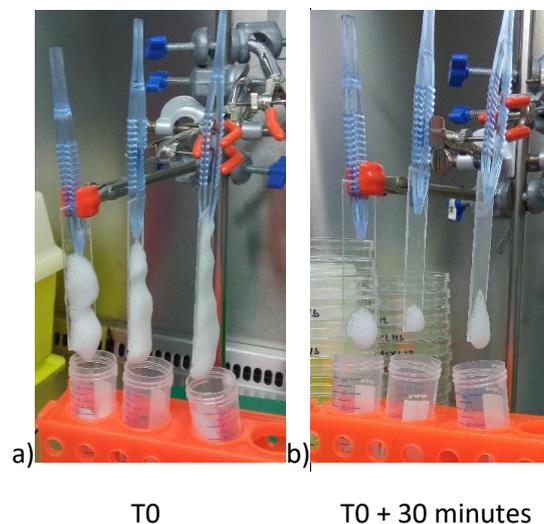


Figure 41. Essais de décontamination en position verticale de 3 supports traités avec une mousse NaOCl 5% contenant 3 g/L de Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T0) et b) après 30 minutes de temps de contact

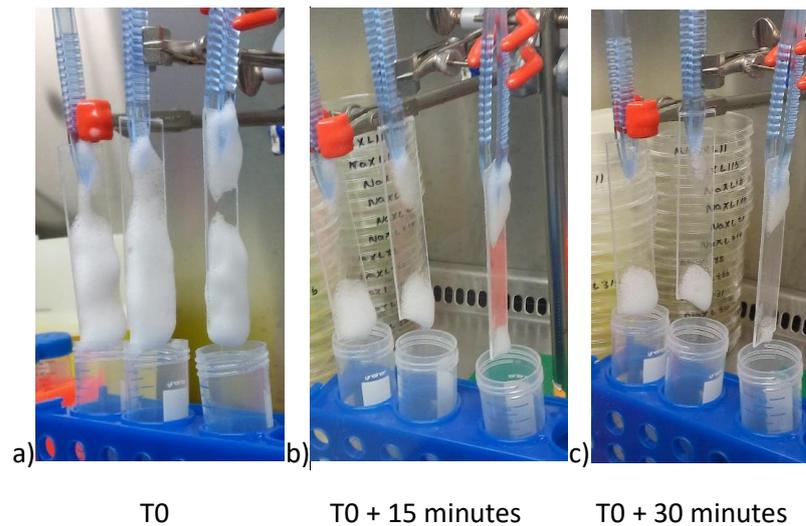


Figure 42. Essais de décontamination en position verticale de 3 supports traités avec une mousse H₂O₂ 12% contenant 3 g/L de Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T0) ; b) après 15 minutes de contact et c) après 30 minutes

Cette mousse contenant une fraction liquide de $5,7 \pm 0,8\%$ a tendance à glisser sous son propre poids le long de la paroi verticale. Même si ces mousses glissent le long de la paroi, l'épaisseur du film de mouillage créée par la mousse est suffisante pour assurer la décontamination des spores. En position horizontale le film de mouillage est statique. Le renouvellement du désinfectant dans le film de mouillage se fait par gravitation lors du drainage de la couche de mousse supérieure (environ 1,5 cm). Dans le cas de mousses glissantes le long d'une paroi verticale, le film de mouillage devient dynamique (Figure 43).

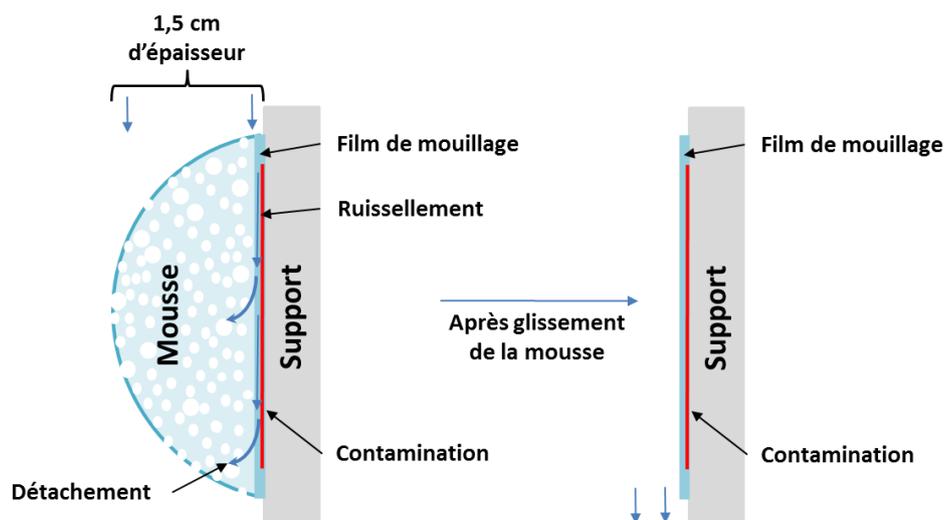


Figure 43. Schéma du mouillage d'un support en position verticale par une mousse aqueuse talochée

Avant le glissement de la mousse au-dessus de la contamination, le film de mouillage est approvisionné en liquide par diffusion de celui-ci du cœur de mousse vers le film de mouillage. De plus, le film de mouillage ruisselle le long de la paroi par gravitation. Le biocide est donc renouvelé dans le film de mouillage au fur et à mesure de sa consommation. Une fois la mousse entièrement glissée, il reste un film de mouillage qui restant à l'air libre s'amincit avant de sécher. Les résultats de ces essais montrent donc que même après le glissement de la mousse sur la contamination, l'épaisseur du film de mouillage reste suffisante pour assurer la décontamination d'au moins 7 logs de spores par les mousses en 30 minutes. Les mousses permettent donc la décontamination de la paroi verticale même après leur glissement.

De plus, une partie des spores est transférée dans la mousse puis emportée avec celle-ci lors de son glissement (plus de 7 logs). Ce détachement des spores est favorisé par le ruissellement du film de mouillage et le glissement de la mousse. Les mousses NaOCl et H₂O₂ qui ont été récupérées dans le tube suite au glissement, ne présentent pas de colonies lors des comptages. La décontamination des spores transférées se fait donc totalement au sein de la mousse. Les spores entrainées dans la mousse lors du glissement peuvent être piégées, facilitant ainsi leur décontamination.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl et H₂O₂ ne contenant pas de Xanthane :

Les mousses NaOCl et H₂O₂ ne contenant pas de Xanthane permettent la décontamination de l'ensemble des spores présentes sur le support. Or, les mousses sans Xanthane d'une fraction liquide d'environ 3,3% s'évaporent complètement en 30 minutes (Figure 44 et Figure 45).

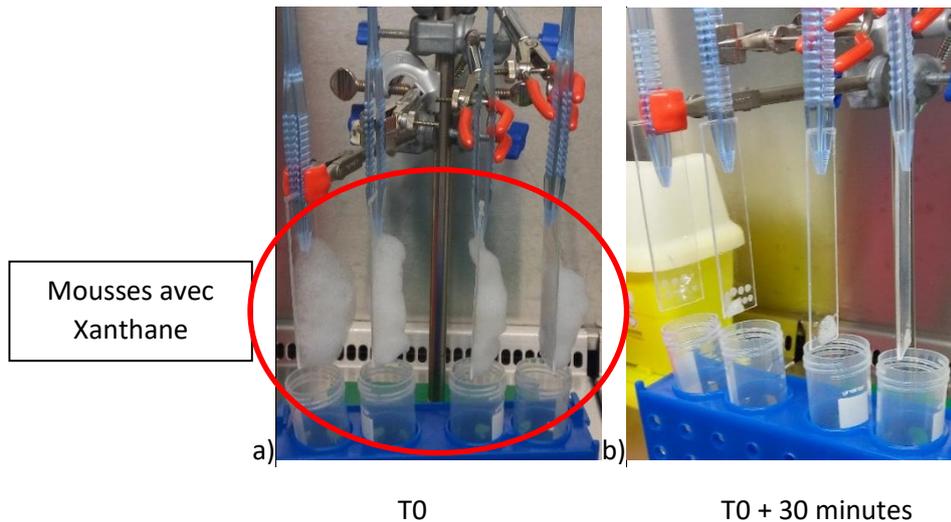


Figure 44. Essais de décontamination en position verticale d'un premier support traité avec une mousse neutre sans Xanthane et de 3 supports traités avec une mousse NaOCl 5% sans Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T0) et b) après 30 minutes de temps de contact

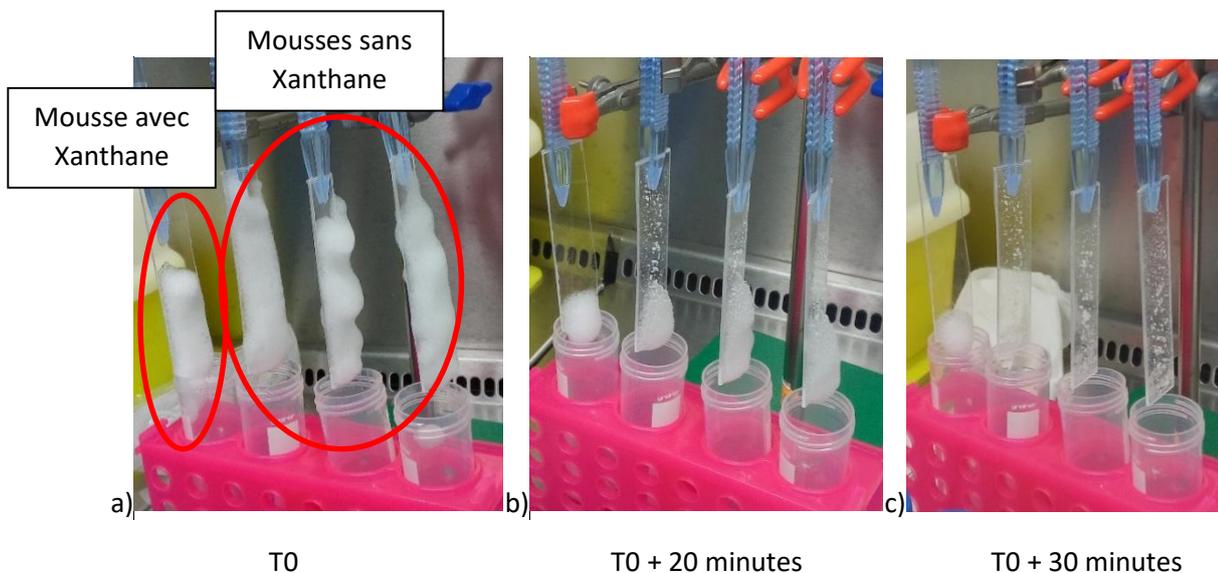


Figure 45. Essais de décontamination en position verticale d'un premier support traité avec une mousse neutre contenant 3 g/L de Xanthane et de 3 supports traités avec une mousse H₂O₂ 12% sans Xanthane ; a) moment où la mousse est déposée (T0) ; b) après 20 minutes de contact et c) après 30 minutes

Les mousses sans Xanthane à cette fraction liquide ne sont pas emportées par leur poids et ne glissent pas le long de la surface. Elles restent adhérentes à la surface et ont un film de mouillage moins dynamique que pour les mousses avec Xanthane. Le film de mouillage peut ruisseler le long de la paroi avant leur évaporation et renouveler en partie le désinfectant

en contact avec les spores. Au cours de l'évaporation, la couche de mousse sur la contamination diminue mais pas l'épaisseur du film de mouillage en contact avec la surface. Après disparition de la mousse, c'est au tour du film de mouillage, laissé à l'air libre, de s'amincir en séchant et de disparaître. Cette évaporation pourrait entraîner une diminution de la performance des mousses par la disparition du film de mouillage mais ce n'est pas le cas avec nos mousses. Ainsi, il est possible que même si la mousse s'évapore au cours de l'essai, l'épaisseur du film de mouillage permet un apport suffisant en désinfectant pour assurer la décontamination en 30 minutes avant l'évaporation. De plus, le désinfectant est concentré sur la surface du support suite à la disparition du liquide présent dans la mousse par évaporation. Cette concentration en désinfectant permet une activité de décontamination de quelques minutes sur les spores même après évaporation de l'ensemble de la mousse et du film de mouillage.

En conclusion de l'ensemble de ces essais, les mousses NaOCl permettent la décontamination de 7 logs de spores de Bt en 30 minutes de contact après leur talochage sur une surface verticale. Même après le glissement de la mousse ou son évaporation, le film de mouillage est suffisamment épais et stable sur 30 minutes pour permettre la décontamination des supports en position verticale. Pour la mousse H₂O₂, la décontamination totale des supports est quasiment atteinte dans ce laps de temps. Cependant, nous pouvons préconiser de laisser la mousse H₂O₂ pendant un temps de contact plus long afin de s'assurer de la décontamination totale des supports.

3.1.3. Efficacité en remplissage

Après les essais en position horizontale et verticale, l'efficacité de décontamination des mousses en présence de spores de Bt a été testée en remplissage. En effet, lors des chantiers réels de décontamination la mousse pourrait être utilisée en remplissage dans les infrastructures à traiter (bureau, container, wagon, conduit d'aération, ...).

3.1.3.1. Cinétique de décontamination de spores libres injectées dans la solution liquide ou la mousse ($R_{injectées}$)

Les premiers essais en remplissage ont été réalisés avec les spores directement injectées au sein de la mousse ou de la solution liquide. Les spores se retrouvent alors libres dans la matrice et non fixées à un support. Ces essais illustrent l'utilisation de la mousse en remplissage afin de décontaminer des spores toujours en suspension dans l'air après une pulvérisation ou aérosolisation, ou présentes dans le système de ventilation. L'efficacité de décontamination lors de ces essais a été évaluée à trois temps de contact : 10 minutes, 20 minutes et 30 minutes.

3.1.3.1.1. Critère de validation préalable du protocole expérimental par le nombre de spores récupérées suite à un traitement neutre

Dans un premier temps, nous avons étudié la quantité de bactéries récupérée après injection des spores dans une mousse ou solution liquide neutre. Sur l'ensemble des essais en remplissage sans support, le pourcentage moyen de récupération est de 63% de spores ($6,26 \times 10^7$ spores des 10^8 injectées). Ainsi, la récupération durant le protocole est équivalente au deux tiers du nombre de spores déposées. La partie de spores manquante est due à l'adhésion des spores sur les surfaces avec lesquelles elles entrent en contact durant le protocole comme les cônes, tubes et eppendorfs®. Les essais sont réalisés avec la présence ou non du Xanthane ainsi que sous une forme liquide ou mousse sans biocide. Quand les spores sont déposées dans la mousse la récupération est équivalente à celle pour la solution liquide (p-value = 0,408). De même, pour les essais avec une mousse contenant ou non du Xanthane, il n'existe pas de différence de récupération (p-value = 0,551). Sans utiliser de support, la récupération en fin d'essai est bien supérieure à 7 logs et représente les deux tiers de la quantité en spores déposées.

3.1.3.1.2. Efficacité de décontamination de spores libres dans les mousses biocides

Ces mêmes essais ont ensuite été réalisés avec des solutions liquides contenant les biocides, puis avec les mousses.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination des solutions liquides NaOCl à 2,5% :

Dans un premier temps, différentes formulations ont été testées en solution liquide afin de déterminer le rôle du Xanthane dans l'efficacité de décontamination. Pour les solutions NaOCl à 2,5%, en absence de Xanthane la réduction en spores est de $5,80 \pm 0,66$ log en 10 minutes et totale en 20 minutes ($7,8 \pm 0,1$ log) (Figure 46).

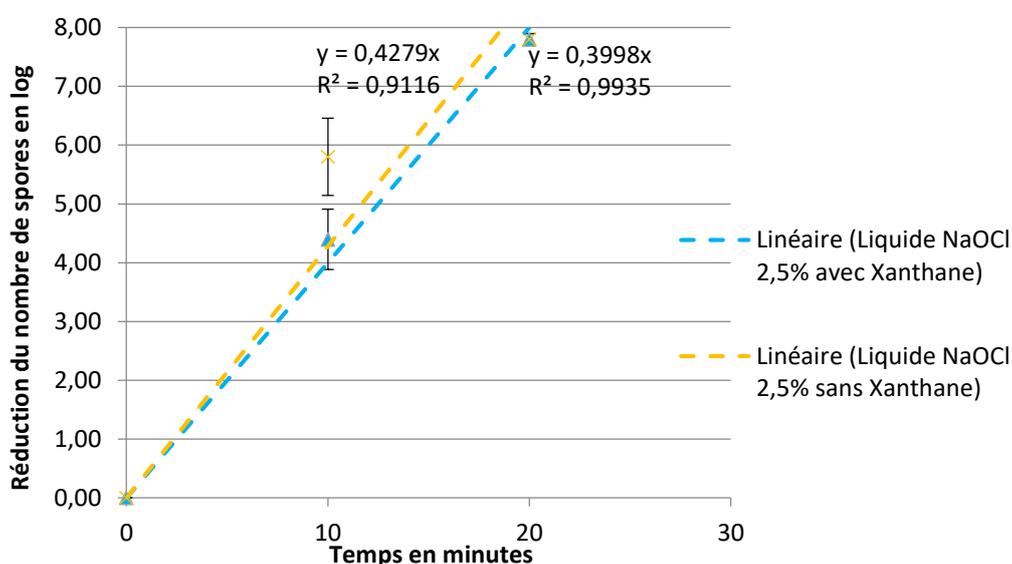


Figure 46. Cinétique de décontamination en remplissage sans support des solutions liquides NaOCl à 2,5% et 11 g/L de Glucopton®, contenant ou non 3 g/L de Xanthane, à température ambiante

L'efficacité de décontamination de la solution liquide NaOCl 2,5% contenant cette fois du Xanthane est différente à 10 minutes (p -value = 0,038) avec une réduction de $4,4 \pm 0,51$ log de spores. Elle atteint par contre plus de 7 logs avant 20 minutes.

Des essais avec un tensiomètre à anneau de Du Nouÿ ont permis de montrer qu'en présence de Glucopton®, la tension superficielle de la solution passe de $68 \pm 0,134$ mN/m à $27,31 \pm 0,048$ mN/m. L'apport en Xanthane à une solution contenant déjà du Glucopton® ne modifie en rien sa tension superficielle ($27,31 \pm 0,048$ mN/m sans Xanthane et $26,93 \pm 0,079$ mN/m avec Xanthane). Le Xanthane ne semble pas impacter l'efficacité de décontamination dans ces essais ainsi que la tension superficielle des solutions liquides.

En conclusion, ces essais mettent en évidence que le Xanthane ne modifie pas l'efficacité de décontamination quand les spores sont injectées dans les solutions liquides NaOCl à 2,5%.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination des solutions liquides H₂O₂ à 12% :

Pour la solution liquide contenant H₂O₂ à 12% (Figure 47), à 10 minutes de temps de contact la décontamination est la même pour les trois formulations allant de 0,47 ± 0,12 log de spores à 0,94 ± 0,3 log (p-value > 0,05 entre les trois formulations). Après 20 minutes, la solution liquide sans additifs montre une meilleure efficacité de décontamination que les deux autres (3,69 ± 0,23 log et p-value < 0,05). Après 30 minutes de contact la décontamination atteint environ 5 logs pour l'ensemble des trois solutions liquides H₂O₂ (p-value > 0,05 entre les trois formulations).

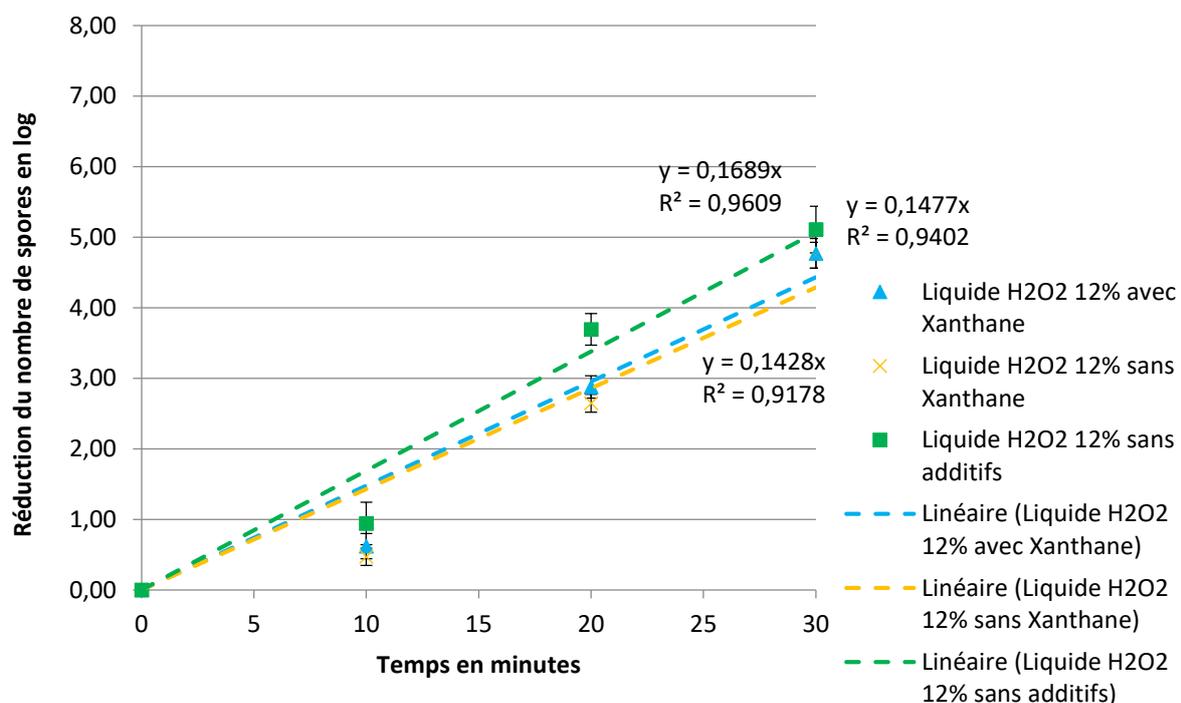


Figure 47. Cinétique de décontamination en remplissage sans support des solutions liquides H₂O₂ à 12% contenant 3 g/L de Xanthane ou sans Xanthane ou sans additifs à température ambiante

L'ensemble des solutions liquides ont la même vitesse de décontamination. Les solutions avec ou sans additifs permettent une décontamination d'environ 7 logs de spores en 40 à 45 minutes (environ 5 logs en 30 minutes). De fait, l'ajout de Glucopon® n'améliore

pas l'efficacité de décontamination des solutions liquides contenant H_2O_2 comme désinfectant. L'efficacité de décontamination des solutions liquides n'est pas influencée par la présence d'un des deux additifs.

En conclusion, quelle que soit la formulation des solutions liquides H_2O_2 la cinétique de décontamination est la même. Ces solutions ne permettent pas la décontamination de plus de 5 logs de spores libres en 30 minutes.

L'ensemble des essais avec les solutions liquides NaOCl et H_2O_2 a démontré que sous cette forme le GlucoPON et le Xanthane n'impactent pas les cinétiques de décontamination des biocides sur des spores libres.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl à 2,5% :

Sous forme de mousse l'efficacité de décontamination de NaOCl à 2,5% contenant du Xanthane est de $2,49 \pm 0,45$ log après 10 minutes et de $6,32 \pm 0,66$ log au bout de 20 minutes de contact. La décontamination totale des spores avec cette mousse nécessite environ 30 minutes de contact. Sans Xanthane cette même mousse entraîne une réduction en nombre de spores de $1,15 \pm 0,48$ log en 10 minutes, puis $1,82 \pm 0,32$ log après 20 minutes. Après 30 minutes de contact cette mousse NaOCl sans Xanthane ne permet qu'une diminution de $3,91 \pm 0,46$ log du nombre de spores (Figure 48).

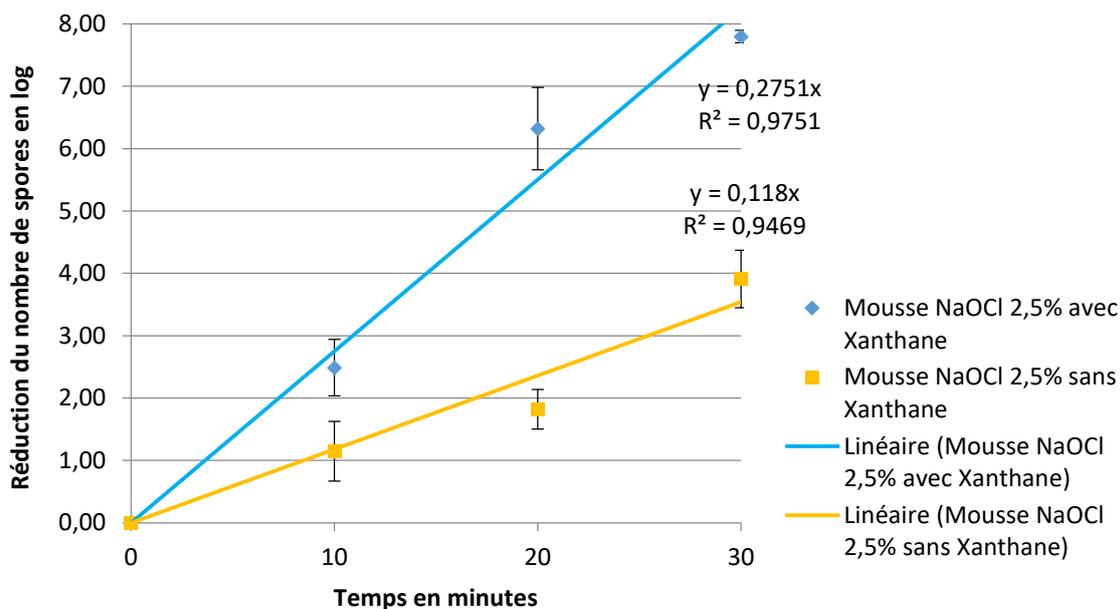


Figure 48. Comparaison de la cinétique de décontamination en remplissage sans support entre les mousses NaOCl à 2,5%, contenant 3 g/L de Xanthane ou sans Xanthane, à température ambiante

Ces essais mettent en évidence une meilleure efficacité de décontamination des mousses contenant du Xanthane par rapport à celles n'en contenant pas. Grâce aux équations de pente d'ordre un, nous avons estimé qu'il faut environ 23 minutes pour décontaminer 7 logs de spores avec la mousse contenant du Xanthane et environ 1 heure pour celle sans Xanthane. Cette différence d'efficacité peut être due à une concentration en désinfectant plus élevée dans les mousses avec Xanthane que celles sans Xanthane. En effet, la fraction liquide dans les mousses contenant du Xanthane est toujours plus élevée (environ 5,5%) que pour les mousses sans Xanthane (environ 3,5%), avec les mêmes paramètres du générateur. Or, une diminution de la fraction liquide de la mousse a pour conséquence de diminuer la quantité de désinfectant en réserve dans celle-ci.

En conclusion, la mousse NaOCl 2,5% contenant du Xanthane est plus efficace sur les spores libres dans la mousse que celle n'en contenant pas. La mousse contenant du Xanthane permet la décontamination de plus de 7 logs de spores libres en moins de 30 minutes.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl à 5% :

Nous avons réalisé des essais avec des mousses ayant une concentration de 5% en NaOCl au lieu de 2,5% et en 20 minutes de temps de contact seulement, afin de s'assurer que la différence d'efficacité entre les mousses avec et sans Xanthane ne dépendent pas de la concentration (Figure 49).

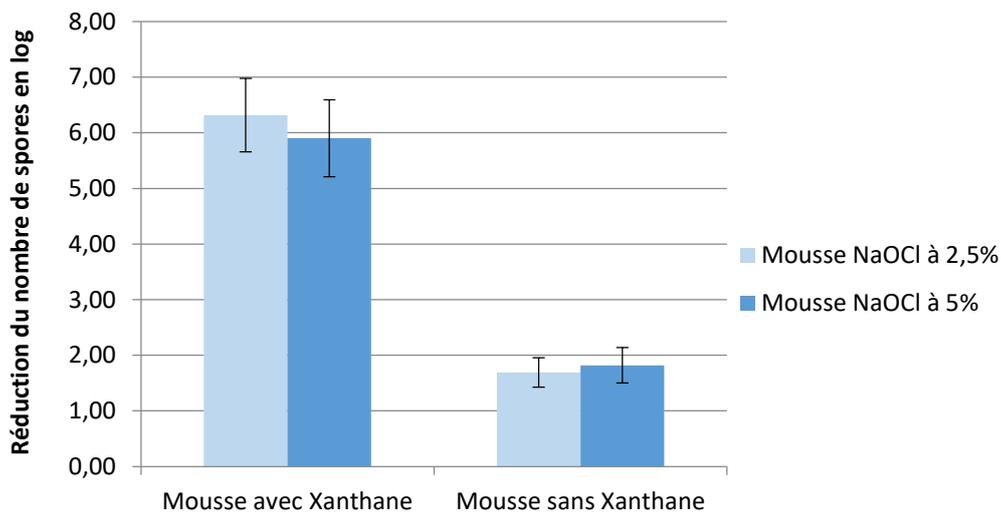


Figure 49. Comparaison de l'efficacité de décontamination en remplissage sans support entre les mousses NaOCl à 2,5% et 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane, à température ambiante après 20 minutes de contact

La réduction en nombre de spores est cette fois de $5,90 \pm 0,69$ log pour les mousses contenant du Xanthane et de $1,69 \pm 0,27$ log pour celles n'en contenant pas. Il n'y a pas de différence d'efficacité de décontamination entre les mousses à 2,5% et 5% à 20 minutes de temps de contact (p -value = 0,394 pour les mousses avec Xanthane et 0,239 pour celles sans Xanthane). Ces résultats tendent à démontrer que la différence d'efficacité entre les mousses NaOCl contenant ou non du Xanthane ne provient pas d'une différence de concentration en désinfectant de ces mousses. Il est alors possible que la présence de Xanthane dans la mousse permette de piéger plus facilement les spores les rendant moins mobiles. Les spores piégées vont donc avoir un point de contact avec le désinfectant qui va durer dans le temps. L'attaque du désinfectant sur ce point d'ancrage de la spore contribue à l'amélioration de l'efficacité de décontamination. La mousse ne contenant pas de Xanthane ne permettrait pas de piéger suffisamment les spores pour qu'un ancrage durable se fasse entre elles et la mousse.

En conclusion, la différence de concentration n'est pas à l'origine de la différence d'efficacité de décontamination entre les mousses contenant du Xanthane et celles n'en contenant pas. L'amélioration de l'efficacité de décontamination de la mousse par l'apport de Xanthane serait due au piégeage des spores grâce à l'augmentation de la viscosité de la mousse, rendant plus facile l'accès des spores aux désinfectants.

Enfin, la comparaison entre les résultats avec les solutions liquides et avec les mousses, montre que le passage sous forme de mousse entraîne une diminution de la vitesse de décontamination. Ces essais étant réalisés avec 1 mL de solution liquide et 20 mL de mousse d'environ 5,5% de fraction liquide, la concentration en désinfectant présent dans les tubes est la même pour tous les essais. Il est possible que la sédimentation des spores soit suffisamment rapide pour que les spores se retrouvent déposées sur le fond du tube. Les spores deviennent alors immobiles et ont un point de contact durable avec le désinfectant dans le liquide.

- Evaluation de l'efficacité de décontamination des mousses H₂O₂ à 12% :

Sous forme de mousse, la décontamination de l'ensemble des formulations après 10 minutes de temps de contact est la même que pour les solutions liquides (moyenne environ $0,6 \pm 0,27$ log de spores et p-value > 0,05 entre l'ensemble des formulations sous forme liquide et mousse). La décontamination après 20 minutes est de $1,1 \pm 0,5$ log pour la mousse H₂O₂ sans Xanthane et de $1,62 \pm 0,25$ log pour celle avec du Xanthane (p-value = 0,89 entre les deux). Au bout de 30 minutes de temps de contact cette décontamination n'a pas évolué car elle est de $1,54 \pm 0,48$ log pour la mousse H₂O₂ sans Xanthane et de $1,72 \pm 0,53$ log pour celle avec du Xanthane (p-value = 0,62 entre les deux) (Figure 50).

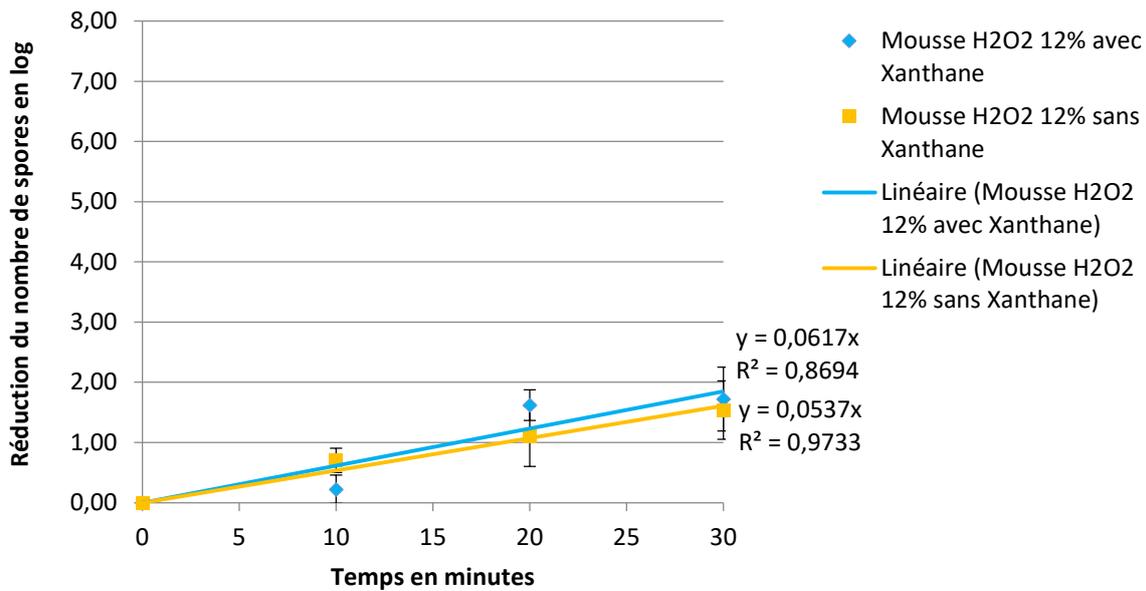


Figure 50. Comparaison de la cinétique de décontamination en remplissage sans support entre les solutions liquides et les mousses H₂O₂ à 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante

De même que pour les solutions liquides, il n'y a aucune différence d'efficacité entre les mousses H₂O₂ contenant ou non du Xanthane. Il existe une différence d'efficacité de décontamination importante entre les mousses H₂O₂ et les solutions liquides. Il faudrait environ 2 heures de temps de contact pour décontaminer 7 logs avec les mousses H₂O₂ et 40-45 minutes pour les mêmes solutions sous forme liquide. Cette différence d'efficacité de décontamination entre les solutions liquides et les mousses est plus importante pour la mousse H₂O₂ que pour la mousse NaOCl.

En conclusion, les mousses H₂O₂ ne permettent pas de décontaminer efficacement les spores libres au sein de la mousse en 30 minutes (réduction de 2 logs). De plus, comme pour NaOCl, les solutions liquides semblent permettre d'atteindre plus rapidement la décontamination des 7 logs de spores.

3.1.3.2. Cinétique de décontamination suite à l'immersion d'un support contaminé avec des spores dans la solution liquide ou la mousse (protocole $R_{support}$)

Le remplissage d'infrastructures entières par la mousse comme des bureaux, des conteneurs ou des wagons, peut-être envisagé afin de décontaminer à la fois les murs, les sols et les plafonds. La mise en œuvre de ces mousses en remplissage diffère de leur utilisation par

talochage et projection sur une paroi en position horizontale ou verticale. Il est donc nécessaire de déterminer si les mousses permettent la décontamination des surfaces en position verticale immergée dans la mousse et si la vitesse de décontamination en est impactée. Des essais ont été réalisés à différents temps de contact et en présence d'un support contaminé tout en dissociant la partie de spores transférée dans les mousses de celle restée adhérente au support.

3.1.3.2.1. Critère de validation préalable du protocole expérimental par le nombre de spores récupérées suite à un traitement par une mousse ou une solution liquide neutre

Comme pour les essais sans support, le nombre de spores récupérées à la suite d'essais sans désinfectant (neutre) a été étudié. Ces essais permettent d'évaluer le nombre de spores transférées dans la mousse et le nombre de spores encore adhérentes au support même après immersion (Figure 51).

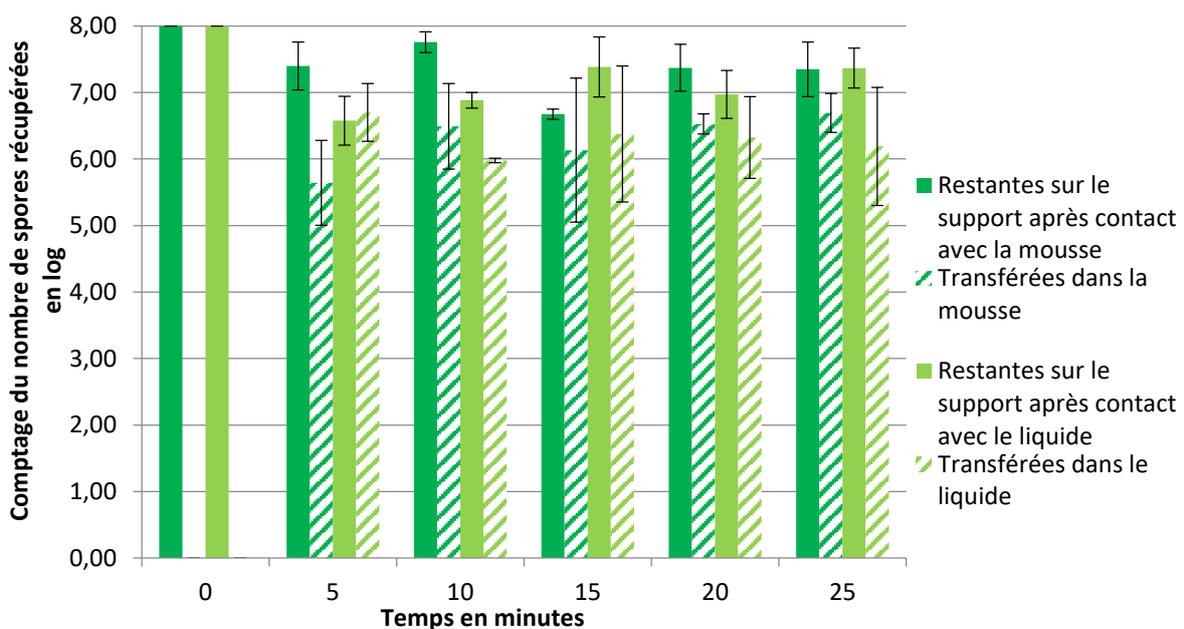


Figure 51. Quantité de spores en log récupérées toutes les cinq minutes, sur le support immergé à la verticale et après transfert dans une mousse ou une solution liquide sans désinfectant mais avec 3 g/L de Xanthane

Ces résultats montrent que la quantité de spores adhérentes au support est de plus de 7 logs (entre $6,68 \pm 0,08$ log et $7,76 \pm 0,15$ log) alors que celles transférées dans la mousse est d'environ 6 log (entre $5,64 \pm 0,64$ log et $6,69 \pm 0,29$ log). La différence entre la partie de spores adhérentes sur le support de celles transférées dans la mousse est statistiquement différente (p -value < 0,05). Pour les essais en solution liquide la quantité de spores restante sur le support

est en moyenne de 7 logs (entre $6,58 \pm 0,37$ log et $7,38 \pm 0,45$ log) et pour celles transférées dans la solution liquide est d'environ 6 logs (entre $5,98 \pm 0,03$ log et $6,70 \pm 0,43$ log). La différence entre la quantité adhérente et celle transférée est moins visible que pour les essais avec la mousse. Ces essais en remplissage avec support indiquent une récupération d'environ 29% suite à un traitement avec une mousse ou une solution liquide. Ces résultats sont en adéquation avec ceux des essais réalisés sur les différents supports en position horizontale présentés en partie 3.1.1.1 (récupération polystyrène = 33%). La récupération en présence d'un support est donc la même que ce soit en position horizontale ou en remplissage. Cette récupération représente environ un tiers des spores déposées. Cependant, les essais en remplissage avec la mousse et la solution liquide sans support indiquent une récupération en moyenne de 62% (partie 3.1.3.1.). L'utilisation d'un support modifie donc la répartition des spores au cours du protocole expérimental. Certaines études ont abordé ces questions complexes de répartition des spores en présence d'un support (Rastogi, Wallace et al. 2009, Tomasino, Rastogi et al. 2010, Edmonds, Sabol et al. 2014). *Tomasino et al.* en 2010, ont constaté que la récupération à la suite de leurs essais se fait en trois parties distinctes. La première partie reste sur les surfaces des outils d'échantillonnage, c'est-à-dire les tubes, les cônes et les eppendorfs®. Une deuxième partie des spores n'est pas récupérée en raison de leur adhésion très forte à la surface du support. Enfin, la troisième partie correspond aux spores récupérées à la fin du protocole expérimental. Ces trois parties coïncident bien aux résultats obtenus pour l'ensemble de nos essais de récupération. Ainsi, les essais en l'absence de support illustrent la perte d'un tiers des spores par adhésion sur les outils d'échantillonnage. Avec l'ajout d'un support cette perte est doublée car en plus de l'adhésion sur les outils d'échantillonnage, les spores restent en partie sur la surface du support.

Dans notre étude, une autre partie est mesurée. Elle correspond à la quantité de spores détachées du support et transférées dans la mousse. En effet, une quantité non négligeable de spores passe très rapidement du support vers la solution liquide ou la mousse. En cinq minutes de contact $6,70 \pm 0,46$ log de spores ont été transférées à l'intérieur de la solution liquide. Pour le transfert à l'intérieur de la mousse, dix minutes sont nécessaires pour transférer $6,49 \pm 0,64$ logs de spores. Même si les résultats de récupération de la mousse semblent meilleurs que ceux de la solution liquide, il n'y a pas de différence significative (p -value > 0,05). Après vingt minutes, la quantité transférée n'a pas changé et se stabilise. La

fraction de spores transférées atteint alors son maximum. Ainsi, après 25 minutes de traitement avec une mousse neutre plus de 7 logs des spores adhèrent encore à la surface. Ce transfert n'est donc pas suffisant pour valider que le support est exempt de contamination. Cependant, il permet le traitement des spores à la fois sur le support mais aussi au sein de la mousse.

3.1.3.2.3. Efficacité de décontamination des mousses

Des essais de cinétique de décontamination des mousses ont été réalisés à une température ambiante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Efficacité de décontamination des solutions liquides H_2O_2 sur le support contaminé :

Dans un premier temps, des essais avec le peroxyde d'hydrogène ont été réalisés, sous forme liquide (Figure 52).

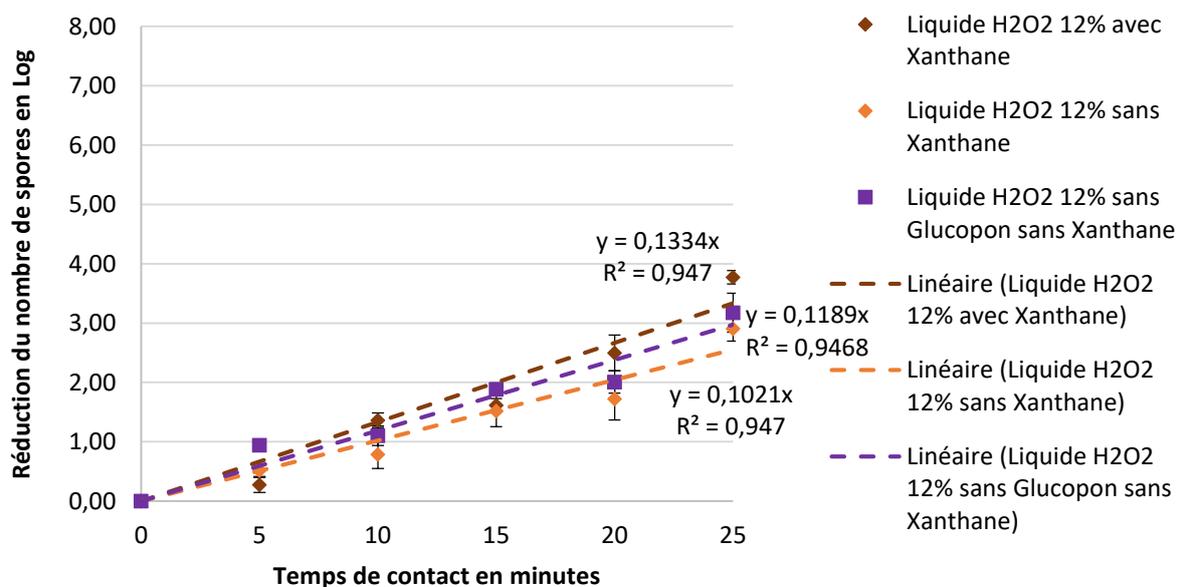


Figure 52. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les solutions liquides H_2O_2 12% contenant ou non des additifs à température ambiante

Les résultats de ces essais ont permis de montrer que la cinétique de décontamination sur le support est la même pour les solutions liquides H_2O_2 contenant ou non les additifs (p -value $> 0,05$). La comparaison entre ces résultats met en évidence l'absence d'impact sur l'efficacité de décontamination du GlucoPON® et du Xanthane. De plus, l'efficacité de décontamination sur les supports par ces solutions liquides est d'environ 3 logs de spores

après 25 minutes de temps de contact (entre $2,91 \pm 0,21$ log et $3,77 \pm 0,11$ log). Même si la décontamination de 7 logs de spores n'est pas atteinte en 25 minutes, les essais sont suffisamment reproductibles ($R^2 = 0.95$ pour les trois solutions liquides) pour pouvoir prédire le temps de contact nécessaire aux solutions liquides H_2O_2 pour décontaminer 7 logs de spores (entre 60 et 78 minutes).

En conclusion, les solutions liquides H_2O_2 avec ou sans Xanthane, permettent de décontaminer en remplissage 7 logs de spores de Bt sur un support vertical en plus de 60 minutes.

- Efficacité de décontamination des mousses H_2O_2 sur le support contaminé :

Pour la mousse H_2O_2 la décontamination du support se fait totalement en 45 minutes maximum de temps de contact (réduction de $7,30 \pm 0,07$ log) (Figure 53).

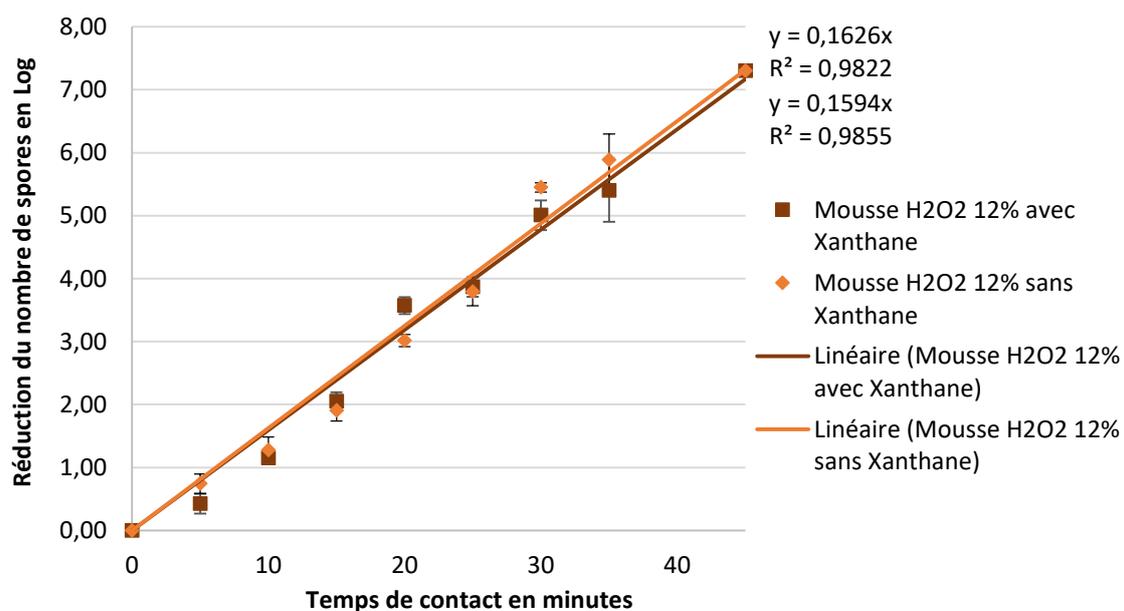


Figure 53. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les mousses H_2O_2 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante

La cinétique de décontamination de ces deux mousses H_2O_2 ne présente pas de différence significative avec celle des trois solutions liquides (p -value > 0,05). Entre les deux mousses, seuls les résultats d'efficacité de décontamination sur le support à 20 et 30 minutes sont statistiquement différents avec respectivement une p -value de 0,006 et 0,035. Ainsi, comme pour les solutions liquides, l'efficacité de décontamination des mousses H_2O_2 n'est pas

influencée par la présence ou l'absence de Xanthane dans la formulation. De plus, les résultats de ces essais sont très reproductibles ($R^2 = 0,98$). Cette reproductibilité des résultats permet de mettre en évidence que les mousses H_2O_2 décontaminent aussi bien voire plus rapidement les spores sur la surface, que les solutions liquides H_2O_2 (réduction de 7 logs de spores en 45 minutes avec les mousses H_2O_2 et plus d'une heure avec les solutions liquides).

En conclusion, les mousses H_2O_2 avec ou sans Xanthane, permettent de décontaminer en remplissage 7 logs de spores de Bt sur un support vertical en environ 45 minutes. De plus, la cinétique de décontamination de ces mousses suit un ordre un. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal *Frontiers in Microbiology* (Annexe 1).

- Efficacité de décontamination des mousses H_2O_2 sur les spores transférées du support à la mousse :

Les mousses H_2O_2 contenant ou non du Xanthane permettent la décontamination totale des spores transférées dans la mousse au bout de 30 minutes (Figure 54).

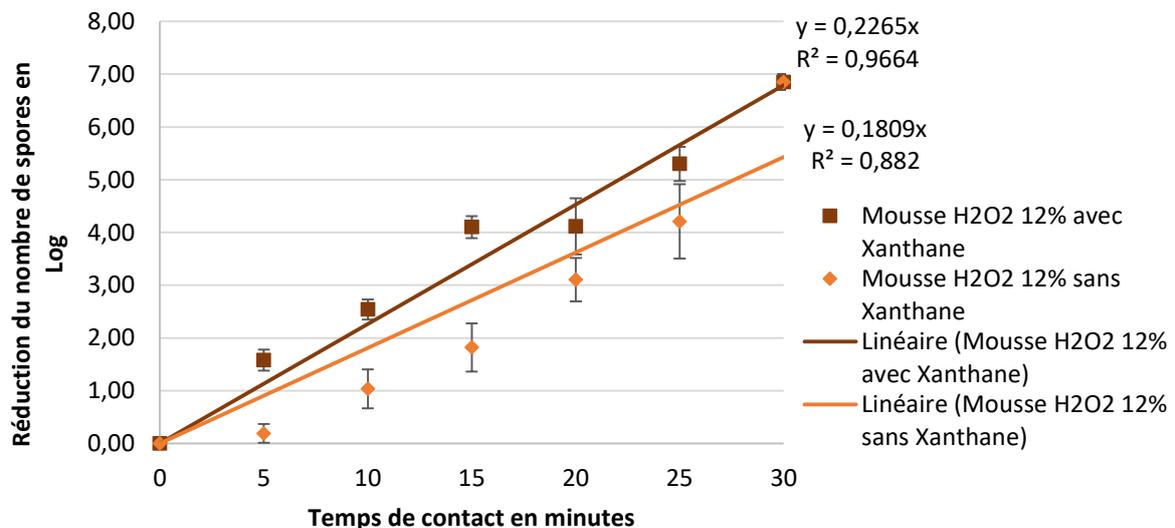


Figure 54. Comparaison de la cinétique de décontamination des spores transférées dans la mousse H_2O_2 12% contenant ou non 3 g/L de Xanthane lors des essais de remplissage avec support à température ambiante.

Cependant, la cinétique entre les mousses contenant ou non du Xanthane est statistiquement différente sauf à 20 minutes de temps de contact (p -value < 0,05 sauf à 20 minutes = 0,088). Il semble y avoir un effet positif du Xanthane sur la vitesse de décontamination dans la mousse H_2O_2 .

En conclusion, les spores transférées dans les mousses H₂O₂ sont toutes inactivées après 30 minutes. Ainsi, les effluents générés à la suite de ce traitement peuvent être considérés comme non contaminés après ce laps de temps.

- Efficacité de décontamination des solutions liquides NaOCl sur le support contaminé :

Nous avons poursuivi cette étude sur la cinétique de décontamination des spores en remplissage avec des solutions liquides NaOCl contenant ou non du Xanthane (Figure 55).

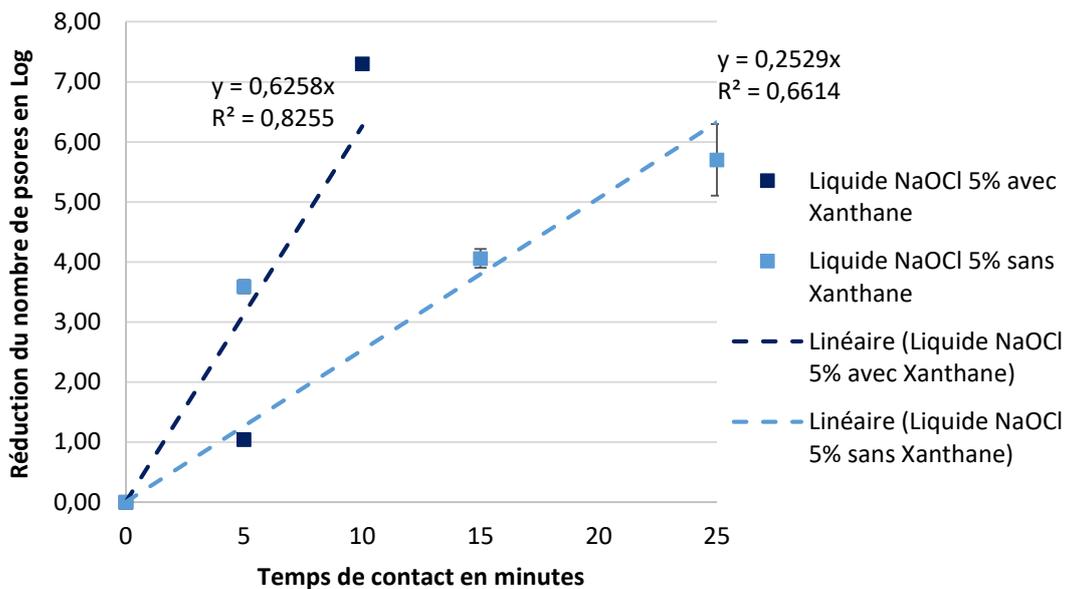


Figure 55. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les solutions liquides NaOCl à 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante.

La solution NaOCl 5% contenant du Xanthane entraîne une décontamination totale de l'ensemble des spores présentes sur le support en 10 minutes de contact. Celle n'en contenant pas permet la décontamination du support de $5,70 \pm 0,60$ log de spores en 25 minutes. Ces premiers résultats montrent l'existence d'une différence d'efficacité de décontamination pour les solutions liquides NaOCl contenant ou non du Xanthane. La cinétique de décontamination de la solution liquide NaOCl est bien plus rapide en présence de Xanthane. En déterminant les fonctions linéaires des droites de LR, nous constatons que les résultats ne suivent pas une cinétique d'ordre un ($R^2 = 0,8255$ avec Xanthane et $0,6614$ sans Xanthane). Il est donc difficile de déterminer le temps de contact exact pour lequel la décontamination dépasse les 7 logs de spores pour la solution liquide NaOCl sans Xanthane.

En conclusion, la solution NaOCl contenant du Xanthane permet la décontamination de 7 logs de spores de Bt en 10 minutes et celle n'en contenant pas en plus de 25 minutes. Le Xanthane semble favoriser l'efficacité de décontamination des solutions liquides NaOCl. De plus, la solution liquide NaOCl inactive plus rapidement les spores que celle à H₂O₂.

- Efficacité de décontamination des mousses NaOCl sur le support contaminé :

Pour les mousses NaOCl, la réduction est d'environ 1 log après 5 minutes de contact avec et sans présence de Xanthane (entre 1,04 ± 0,08 log à 1,45 ± 0,26 log) (Figure 56).

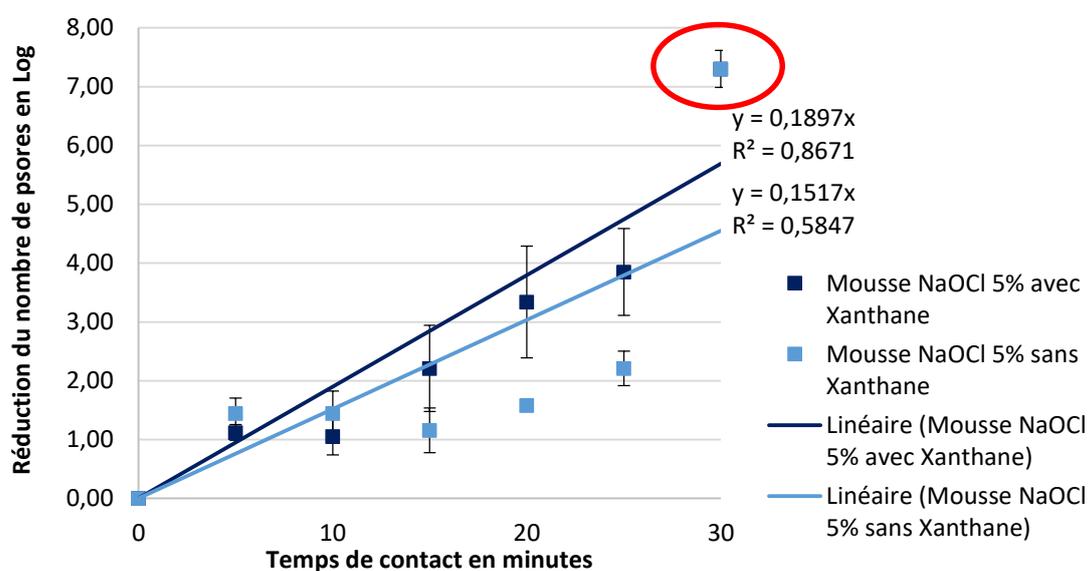


Figure 56. Comparaison de la cinétique de décontamination du support en remplissage entre les mousses NaOCl à 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane à température ambiante.

La décontamination totale des spores est réalisée en 30 minutes. Cependant, les résultats sont très hétérogènes entre 15 minutes et 25 minutes de contact. A 15 minutes de contact la mousse contenant du Xanthane permet la décontamination de l'ensemble des spores sur 2 des 9 supports testés. De même, à 20 et 25 minutes de contact la décontamination totale des supports se fait respectivement pour 3 et 4 essais sur 6. Il faut donc noter que les résultats sur support avec la mousse NaOCl contenant du Xanthane ne sont pas reproductibles d'où les écarts types importants. De plus, à partir de 10 minutes de temps de contact les mousses avec et sans Xanthane ont une efficacité significativement différente. En traçant les droites linéaires de LR pour les mousses NaOCl avec et sans Xanthane, nous constatons, comme pour les solutions liquides, que les cinétiques ne suivent pas un ordre un

($R^2 = 0,8671$ avec Xanthane et $0,5847$ sans Xanthane), ce qui a déjà été constaté dans d'autres études (Sabli, Setlow et al., 1996, March, Cohen et al., 2012).

En conclusion, les mousses NaOCl avec et sans Xanthane permettent la décontamination de 7 logs de spores de Bt sur les supports en remplissage en 30 minutes maximum de contact. La présence de Xanthane semble influencer positivement la décontamination des mousses NaOCl. Il n'est pas possible, avec ces résultats et dans ces conditions, de déterminer si les cinétiques de réaction des mousses NaOCl suivent bien un ordre un.

- Efficacité de décontamination des mousses NaOCl sur les spores transférées du support à la mousse :

Pour la décontamination s'opérant sur les spores transférées au sein de la mousse les résultats sont identiques pour les deux mousses à tous les temps de contact hormis à 20 minutes (p -value $>0,05$ sauf à 20 minutes = $0,017$) (Figure 57).

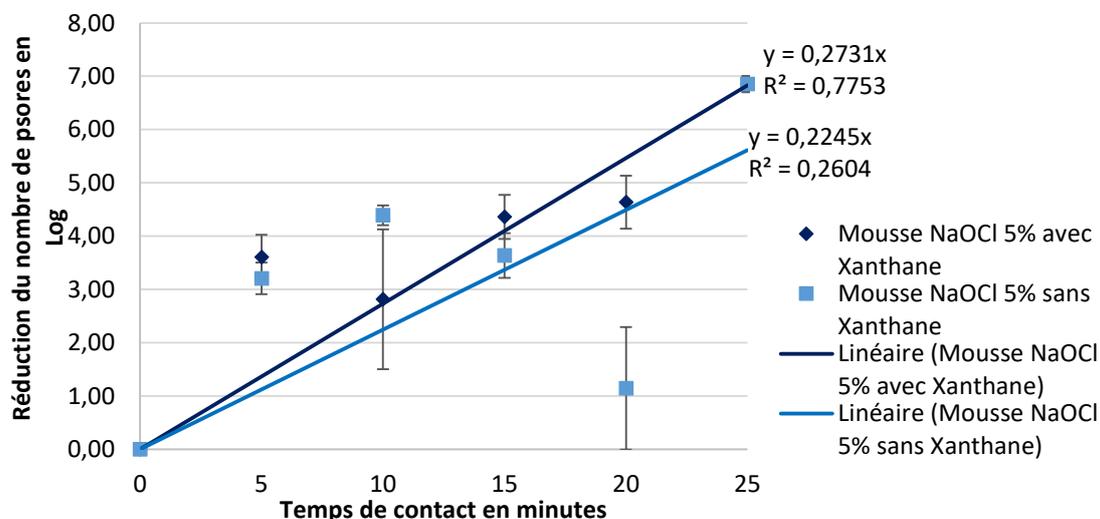


Figure 57. Comparaison de la cinétique de décontamination des spores transférées dans la mousse NaOCl 5% contenant ou non 3 g/L de Xanthane lors des essais de remplissage avec support à température ambiante.

Pour les essais avec la mousse NaOCl contenant du Xanthane la disparité des résultats est importante à 15 minutes (7 essais sur 13 ne présentent pas de colonies). De même, pour la mousse NaOCl sans Xanthane, l'efficacité de décontamination (LR) varie de 2,66 à 6,28 logs à ce même temps de contact. La totalité des spores transférées dans ces deux mousses est

neutralisée en 25 minutes maximum de contact. En traçant les courbes de tendance linéaire de LR, nous constatons que les pentes ne suivent pas un ordre un ($R^2 = 0,7753$ avec Xanthane et $0,2604$ sans Xanthane).

En conclusion, les spores transférées dans la mousse sont entièrement décontaminées en 25 minutes maximum mais la décontamination avant ce laps de temps n'est pas garantie.

- Mesure de l'effet du Xanthane sur les propriétés physico-chimiques des mousses neutres, NaOCl et H₂O₂ :

La viscosité et la stabilité dans le temps de la mousse peuvent influencer l'efficacité de décontamination des mousses. L'utilisation du Xanthane comme agent stabilisant permet l'augmentation de la viscosité de la mousse qui lui confère un temps de contact prolongé avec la contamination sur un support en position verticale (Dame, Fritz et al., 2005). Cette étude menée par Dame a démontré l'augmentation de la stabilité des mousses de décontamination radiologique et la durée de leur film de mouillage sur la paroi par l'ajout de Xanthane. Nous avons donc réalisé des essais sur un appareil Foamsan, afin d'étudier l'impact du Xanthane sur la stabilité de nos mousses. Deux propriétés des mousses ont été observées lors de ces essais : le retard au drainage et la vitesse du drainage (Figure 58).

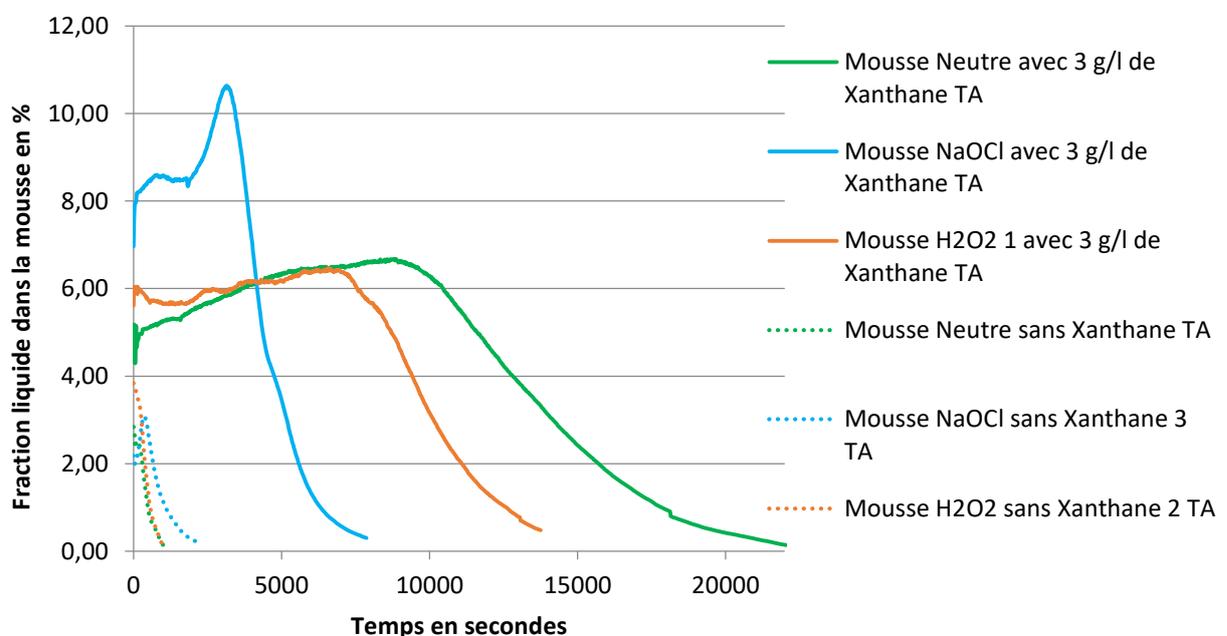


Figure 58. Etude du drainage des mousses NaOCl, H₂O₂ et neutre contenant ou non du Xanthane grâce à un appareil Foamsan à température ambiante.

Les mousses NaOCl sans Xanthane retournent à l'état liquide en 33 minutes tandis que les mousses neutres et H₂O₂ drainent totalement en 17 minutes. Un retard du drainage peut être observé chez certaines mousses NaOCl et H₂O₂ mais ne dépasse pas les 4 minutes et 30 secondes. Les mousses sans Xanthane ne présentent pas de différence significative de vitesse de drainage (p-value > 0,05). En présence de Xanthane le retour à l'état liquide prend 132 minutes pour la mousse NaOCl, 233 minutes pour la mousse H₂O₂ et 345 minutes pour la mousse neutre. Un retard au drainage est observé pour les trois mousses. Ce retard au drainage est de 57 minutes pour la mousse NaOCl, 122 minutes pour la H₂O₂ et 153 minutes pour la neutre.

En se basant sur les résultats d'efficacité de décontamination, l'impact de ce retard au drainage est visible surtout pour la mousse NaOCl dont l'efficacité de décontamination est accélérée. Il est possible que la présence en Xanthane dans la mousse H₂O₂ soit trop importante pour améliorer les performances de décontamination de cette mousse. En effet, la mousse NaOCl semble consommer une partie du Xanthane présent dans la solution moussante et la mousse. Cela explique que le retard au drainage soit plus court pour cette mousse que pour celles H₂O₂ et neutre. La mousse NaOCl drainant plus tôt et plus vite que celle H₂O₂, elle va renouveler plus rapidement le désinfectant dans le film de mouillage en contact avec les spores. Ce renouvellement est possible par l'écoulement de la fraction de liquide drainé le long de la paroi par effet de la gravité. Les parties supérieures de la mousse vont ainsi alimenter en biocide le film de mouillage en contact avec la contamination (Figure 59). Ce renouvellement plus rapide en désinfectant permet d'augmenter l'efficacité de la mousse NaOCl et ainsi sa cinétique de décontamination. De plus, l'effet accru de ruissellement sur la paroi verticale peut contribuer à faciliter le détachement des spores du support les rendant plus disponibles au biocide. Pour la mousse H₂O₂ contenant du Xanthane, la viscosité de la mousse serait trop importante. Le Xanthane dans la mousse a un rôle important dans la vitesse de décontamination des mousses. Cependant, sa concentration dans la mousse ne doit pas être en excès pour ne pas empêcher l'effet positif du drainage sur l'efficacité de décontamination.

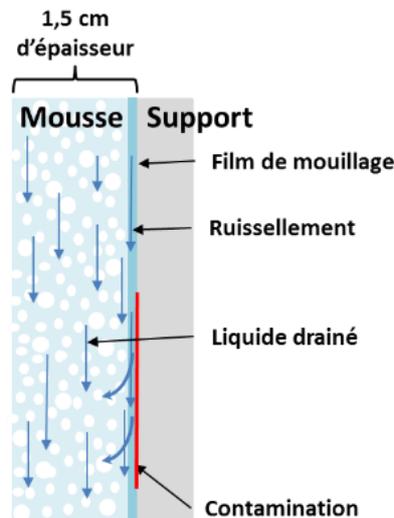


Figure 59. Schéma du mouillage d'un support immergé dans la mousse en position verticale

Cependant, l'ajout du Xanthane à la formulation de nos mousses reste nécessaire pour son utilisation en remplissage. La plupart des mousses dans le commerce n'ont pas ou peu d'agent gélifiant dans leur formulation. Il est nécessaire d'appliquer plusieurs fois sur les supports certaines de ces solutions pour assurer les temps de contact recommandés par le fabricant pour la décontamination verticale (*Edmonds, Sabol et al., 2014*). Elles ne peuvent donc pas être utilisées en remplissage lors des opérations de décontamination car leur drainage est trop rapide ou leur fraction liquide trop importante (exemples DF-200 et CASCAD) (*Environmental Protection Agency, 2010*). Dans notre étude, même si les mousses sans Xanthane ont une efficacité de décontamination finale identique aux mousses avec Xanthane, sur de grand volume, leur utilisation ne permettra pas d'assurer un bon remplissage. La présence de Xanthane et la fraction liquide à environ 5,5% de nos mousses sont de véritables atouts pour leur utilisation en remplissage d'infrastructure de grands volumes.

Nos mousses contenant du Xanthane ont quand même la capacité de drainer entièrement après un certain temps. La récupération des effluents en est donc facilitée. En effet, après dépôt ou remplissage, la mousse peut-être tout simplement laissée à drainer jusqu'à son retour total à l'état liquide avant d'être aspirée. Ce retour à l'état liquide facilite sa récupération lors des opérations de décontamination, ce qui n'est pas le cas pour des mousses solides comme celles contenant du polyuréthane ou de l'agar-agar. De plus, avec une telle fraction liquide (5,5%) dans nos mousses, il suffit de 5,5 L de solution liquide pour produire 100 L de mousse. Par conséquent, la quantité d'effluents est considérablement

réduite à la fin du traitement, ainsi que la quantité de matières premières (solution moussante liquide) nécessaire pour décontaminer une même surface. Or, l'utilisation d'une mousse entraîne la même efficacité de décontamination que les solutions liquides sur un même laps de temps (45 minutes pour H₂O₂) ou en seulement 20 minutes de plus (30 minutes pour la mousse NaOCl contre 10 minutes pour la même solution liquide). L'utilisation des mousses est donc bien adaptée aux opérations de décontamination des sites où l'accès est difficile (tuyaux, plafonds, murs avec ou sans fissures et zones situées derrière les équipements) par leur stabilité en remplissage, leur récupération facilitée après utilisation et leur peu de matières premières nécessaires.

En conclusion, le film de mouillage des mousses formé sur le support en position verticale est suffisamment recouvrant et stable pour permettre la décontamination de 7 logs de spores en 30 minutes pour la mousse NaOCl et 45 minutes pour celle H₂O₂. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par talochage de la mousse sur des parois verticales où la décontamination des supports est totale pour la mousse NaOCl en 30 minutes mais nécessite un peu plus de temps pour celle H₂O₂. La stabilité du film de mouillage de la mousse utilisée en remplissage est rendue possible par l'ajout de Xanthane. Cependant, la concentration en Xanthane dans ces mousses permet son drainage et donc le renouvellement du désinfectant par le ruissellement du liquide de drainage le long du support. L'utilisation des mousses contenant du Xanthane est donc adaptée à la décontamination d'infrastructure en remplissage.

3.1.3.3. Efficacité de décontamination des mousses à différentes températures

La mousse devant être déployée dans des environnements extérieurs, nous nous sommes demandés si des variations de températures peuvent impacter significativement la cinétique de décontamination des mousses. Nous avons ainsi testé l'efficacité de décontamination des mousses à différentes températures suivant le même protocole que les essais de cinétiques de décontamination (protocole R_{support}). Les températures choisies pour ces essais sont représentatives de celles pouvant être rencontrées au cours d'opérations de décontamination en extérieur. Ainsi, nous avons réalisés ces essais à 4°C (température d'une chambre froide) et à 30°C (en étuve), avec un temps de contact de 25 min.

3.1.3.3.1. Efficacité de décontamination des mousses à 4°C

Dans un premier temps nous avons évalué l'efficacité de décontamination des mousses à 4°C suivant le protocole R_{support} et avec 25 minutes de temps de contact.

- Efficacité de décontamination des mousses NaOCl 2,5% et H₂O₂ 12% à 4°C :

Des essais ont été réalisés avec les mousses et les solutions liquides contenant ou non du Xanthane (Figure 60).

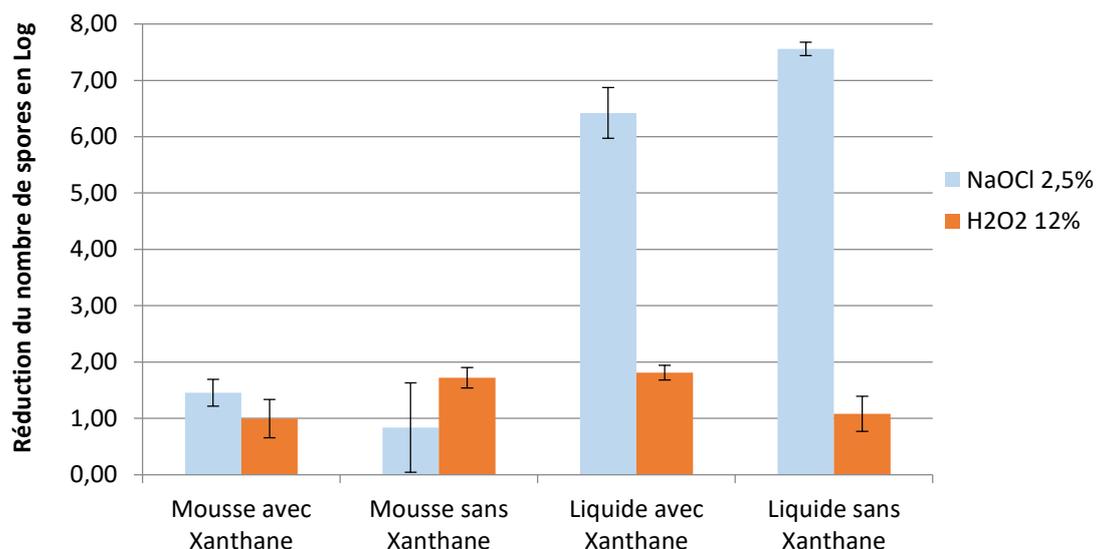


Figure 60. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 4°C pour les mousses et solutions liquides de NaOCl à 2,5% et H₂O₂ 12% avec et sans Xanthane et sans additifs en 25 minutes de temps de contact

Les essais sous forme de solutions liquides montrent des résultats très différents entre les désinfectants. La décontamination des supports est quasiment totale pour les solutions liquides de NaOCl 2,5% contenant ou non du Xanthane (p -value > 0,05). Pour H₂O₂ 12%, la décontamination des supports est de $1,81 \pm 0,13$ log avec Xanthane et $1,08 \pm 0,18$ log sans Xanthane (p -value = 0,108). Ces résultats indiquent que la solution liquide NaOCl permet la décontamination de la quasi-totalité des spores sur les supports. De plus, le Xanthane ne semble pas avoir d'effet bénéfique sur les solutions contenant l'un ou l'autre des désinfectants.

Pour les mousses, en présence de Xanthane, NaOCl 2,5% permet une décontamination de $1,45 \pm 0,24$ log et celle H₂O₂ 12% de $0,99 \pm 0,34$ log ce qui représente environ 10% du

nombre de spores présent sur le support. En l'absence de Xanthane l'efficacité de décontamination de ces mousses est de $0,84 \pm 0,79$ log pour NaOCl et de $1,72 \pm 0,18$ log avec H₂O₂. Il n'y a pas de différence d'efficacité entre les mousses contenant ou non du Xanthane (p-value de 0,917 entre les mousses NaOCl et de 0,209 entre les mousses H₂O₂). De plus, l'efficacité de décontamination des spores après leur transfert dans la mousse est de $4,70 \pm 0,76$ log pour la mousse NaOCl 2,5% contenant du Xanthane et de $2,65 \pm 0,30$ log pour celle avec H₂O₂ 12%. En absence de Xanthane, la réduction du nombre de spores au sein de la mousse est de $2,80 \pm 0,28$ log pour NaOCl et $1,90 \pm 0,21$ log pour celle avec H₂O₂ 12%. L'ensemble de ces résultats montrent que l'utilisation des mousses NaOCl 2,5% et H₂O₂ 12% avec et sans Xanthane ne permet pas la décontamination de 7 logs de spores à 4°C, que ce soit sur le support ou au sein de la mousse. La réaction de neutralisation des spores par les désinfectants est ralentie à cette température. Cependant, il existe une importante différence d'efficacité entre les solutions liquides et les mousses contenant du NaOCl. Nous avons donc essayé de savoir si en optimisant les conditions d'utilisation de la mousse NaOCl à cette température, nous pouvons augmenter son efficacité de décontamination.

En conclusion, aucune des deux mousses ne permet la décontamination de 7 logs de spores de Bt en 25 minutes à 4°C. Seules les solutions liquides NaOCl à 2,5% permettent de se rapprocher ou d'atteindre l'objectif des 7 logs de réduction.

- Efficacité de décontamination des mousses NaOCl à 4°C après l'augmentation du temps de contact ou de sa concentration en désinfectant :

Des essais ont ainsi été réalisés afin de déterminer si une augmentation du temps de contact ou de la concentration en NaOCl permettrait une meilleure efficacité de décontamination à 4°C. La mousse NaOCl 2,5% a donc été testée avec un temps de contact de 1 heure à 4°C. La réduction du nombre de spores sur le support passe de $1,45 \pm 0,24$ log après 25 minutes à $2,36 \pm 0,80$ log après 1 heure de temps de contact. Un temps de contact d'une heure permet de légèrement augmenter le nombre de spores neutralisées au sein de la mousse ($5,78 \pm 1,03$ log au lieu de $2,80 \pm 0,28$ log). Ainsi, l'efficacité de décontamination de la mousse NaOCl 2,5% à 4°C n'est pas significativement améliorée en doublant le temps de contact avec la contamination.

Nous avons poursuivi les essais en doublant la concentration en désinfectant NaOCl (Figure 61).

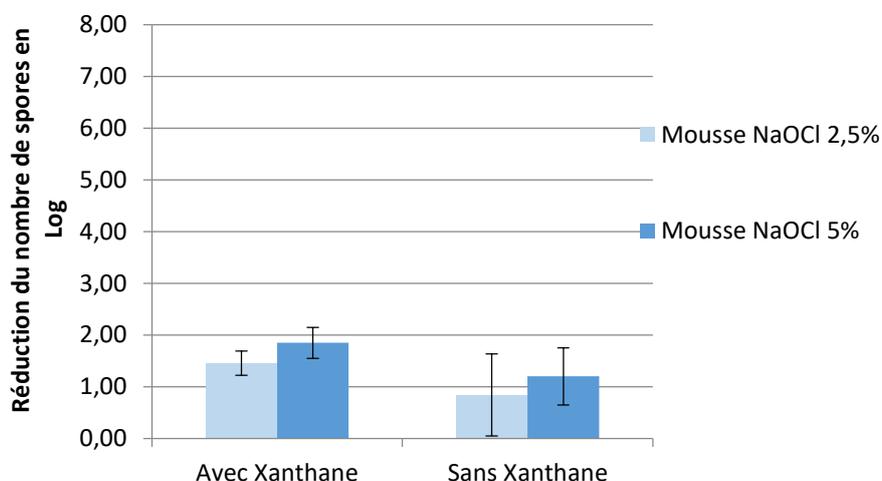


Figure 61. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 4°C pour les mousses NaOCl à 2,5% et 5% avec et sans Xanthane en 25 minutes de temps de contact

L'augmentation de la concentration en NaOCl de 2,5% à 5% ne permet pas d'améliorer l'efficacité de décontamination ($1,85 \pm 0,30$ log de spores avec Xanthane et de $1,20 \pm 0,55$ log sans Xanthane). Il n'y a pas de différence significative entre la mousse NaOCl 5% avec et sans Xanthane à cette température (p -value = 0,4) ni avec les résultats des mousses NaOCl 2,5% (p -value > 0,05). A 4°C les spores transférées au sein des mousses sont réduites de $4,09 \pm 0,78$ log pour celle avec Xanthane et de $3,70 \pm 0,51$ log pour celle sans Xanthane (p -value = 0,159). Ainsi, en doublant la concentration en désinfectant l'efficacité de décontamination sur le support et dans la mousse n'est pas modifiée à cette température.

En conclusion, ces essais confirment que la réaction de neutralisation des spores à 4°C par les mousses est ralentie et que même l'augmentation du temps de contact ou de la concentration en désinfectant ne permet pas d'atteindre une réduction de 7 logs avec cette mousse.

3.1.3.3.2. Efficacité de décontamination des mousses à 30°C

A la suite de ces essais, nous avons réalisé les mêmes évaluations mais avec à une température de 30°C.

- Efficacité de décontamination des mousses NaOCl et H₂O₂ à 30°C :

Des essais ont été réalisés avec les mousses et les solutions liquides contenant ou non du Xanthane (Figure 62).

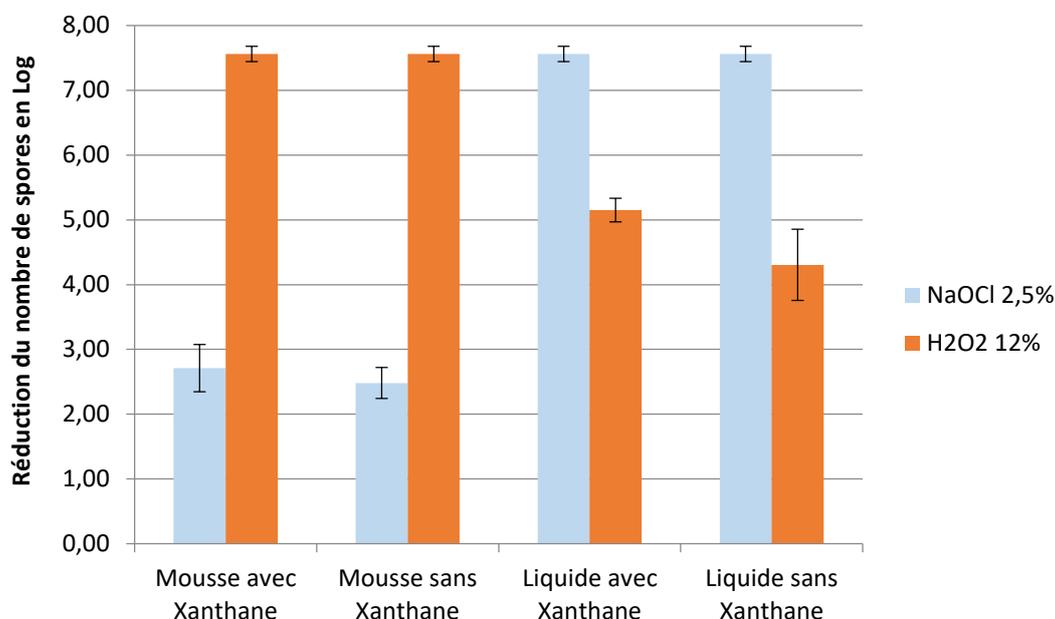


Figure 62. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 30°C pour les mousses et solutions liquides de NaOCl 2,5% et H₂O₂ 12% avec et sans Xanthane et sans additifs en 25 minutes de temps de contact

A 30°C, la mousse NaOCl 2,5% avec Xanthane permet une décontamination de $2,71 \pm 0,36$ log et celle sans Xanthane de $2,48 \pm 0,24$ log sur le support (p -value entre les mousses à 30°C = 0,401). Ces résultats concordent avec ceux obtenus à 4°C et montrent que les mousses NaOCl 2,5% ne permettent pas de décontaminer 7 logs de spores de Bt sur le support à 30°C en 25 minutes de contact. Pour la mousse NaOCl 2,5% sans Xanthane, la réduction du nombre de spores transférées dans la mousse est de $4,75 \pm 0,68$ log. Cependant, la décontamination des spores transférées dans la mousse contenant du Xanthane est cette fois totale ($7,08 \pm 0,12$ log). L'augmentation de la température entraîne l'amélioration de la réduction du nombre de spores transférées dans la mousse contenant du Xanthane mais pas pour celle n'en contenant pas. Les mousses H₂O₂ 12% permettent la décontamination totale de l'ensemble des supports à cette température et ce avec et sans Xanthane ($7,56 \pm 0,12$ log). De la même façon, les spores

transférées dans les mousses H₂O₂ 12% avec et sans Xanthane sont entièrement neutralisées (7,08 ± 0,12 log). Les mousses H₂O₂ 12% permettent la réduction d'au moins 7 logs de spores présentes sur les supports et dans la mousse à 30°C, en 25 minutes de contact.

La décontamination à cette température est moins efficace pour les solutions liquides H₂O₂ 12% que pour les mousses (5,15 ± 0,18 log avec Xanthane et 4,30 ± 0,18 sans Xanthane, p-value entre les liquides et les mousses < 0,05). Il n'y a pas de différence significative entre les solutions liquides quand elles contiennent ou non du Xanthane (p-value = 0,304). L'augmentation de la température a permis d'améliorer de 2-3 logs l'efficacité de décontamination des solutions liquides de H₂O₂. Avec les solutions liquides NaOCl 2,5%, les résultats concordent avec ceux enregistrés à 4°C. Les solutions liquides permettent la décontamination de l'ensemble des supports (7,56 ± 0,12 log). L'ensemble de ces résultats permettent de mettre en évidence qu'à 30°C les mousses H₂O₂ 12% permettent la décontamination de 7 logs de spores mais pas les solutions liquides. A l'opposé, les mousses NaOCl à 2,5% ne permettent pas une telle réduction du nombre de spores alors que les solutions liquides le peuvent. De fait, comme pour les essais à 4°C, nous avons cherché à savoir si une augmentation du temps de contact ou de la concentration en désinfectant permettrait d'atteindre les 7 logs de décontamination.

En conclusion, les mousses H₂O₂ 12% permettent la décontamination de 7 logs de spores en 25 minutes à 30°C, ce qui n'est pas le cas avec les mousses NaOCl à 2,5%. Les solutions liquides NaOCl 2,5% permettent de décontaminer l'ensemble des spores présentes sur les supports à cette température. Les résultats d'efficacité de décontamination à 4°C et 30°C avec les mousses H₂O₂ ont fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal *Frontiers in Microbiology* (Annexe 1) (*Le Toquin, et al.* 2018).

- Efficacité de décontamination des mousses NaOCl à 30°C après l'augmentation du temps de contact ou de sa concentration en désinfectant :

Comme pour les essais à 4°C, des essais ont été réalisés afin de déterminer si une augmentation du temps de contact entre la contamination en spores et la mousse permettrait une meilleure efficacité de décontamination. La mousse NaOCl 2,5% avec Xanthane a donc été testée avec un temps de contact de 1 heure à 30°C. Le nombre de spores encore présentes sur le support après traitement par la mousse a fortement diminué à 30°C. La réduction du

nombre de spores est passée de $2,71 \pm 0,36$ log à $7,56 \pm 0,12$ log en doublant quasiment le temps de contact. Ainsi, l'augmentation du temps de contact améliore la réduction du nombre de spores, permettant même la décontamination d'au moins 7 logs en une heure de contact par la mousse NaOCl 2,5% contenant du Xanthane.

D'autres essais ont été réalisés en parallèle avec une concentration plus élevée en désinfectant NaOCl (Figure 63).

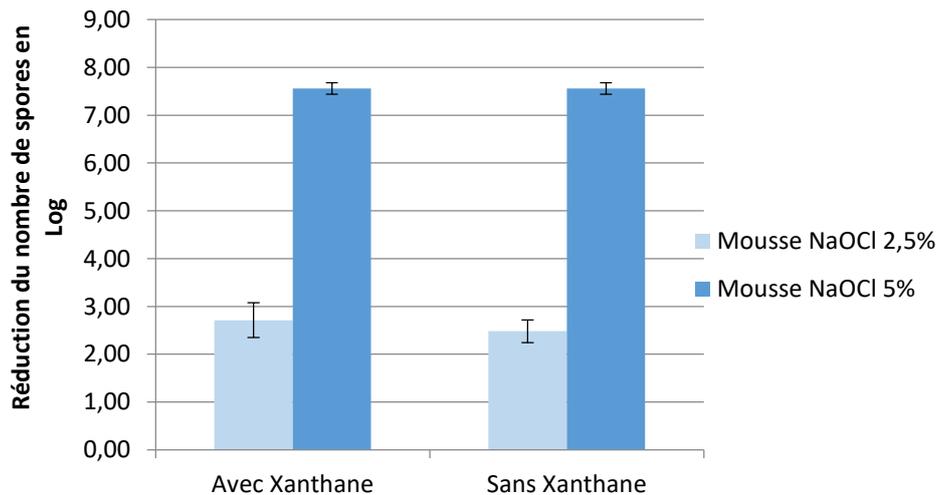


Figure 63. Réduction du nombre de spores en log sur le support à 30°C pour les mousses NaOCl à 2,5% et 5% avec et sans Xanthane en 25 minutes de temps de contact

L'augmentation de la concentration en NaOCl de 2,5% à 5% permet l'amélioration de l'efficacité de décontamination des mousses à 30°C passant d'environ 2-3 logs à plus de 7 logs de spores ($7,56 \pm 0,12$ log). Au sein des mousses NaOCl 5% avec et sans Xanthane, les spores transférées sont entièrement décontaminées ($7,08 \pm 0,12$ log). L'augmentation de la concentration en NaOCl permet d'améliorer suffisamment l'efficacité de décontamination de la mousse afin d'atteindre une réduction de 7 logs de spores sur le support et dans la mousse en 25 minutes à 30°C.

Pour conclure, à l'inverse des essais à 4°C, l'augmentation du temps de contact et de la concentration en désinfectant améliorent toutes les deux l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl à 30°C.

3.1.3.3.3. Comparaison de l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% à 4°C, 20°C et 30°C

La comparaison entre les résultats d'efficacité de décontamination des mousses à 4°C, 20°C et 30°C en 25 minutes de contact, permet de mettre en évidence une augmentation de l'efficacité de décontamination des mousses en fonction de l'élévation de la température (Figure 64).

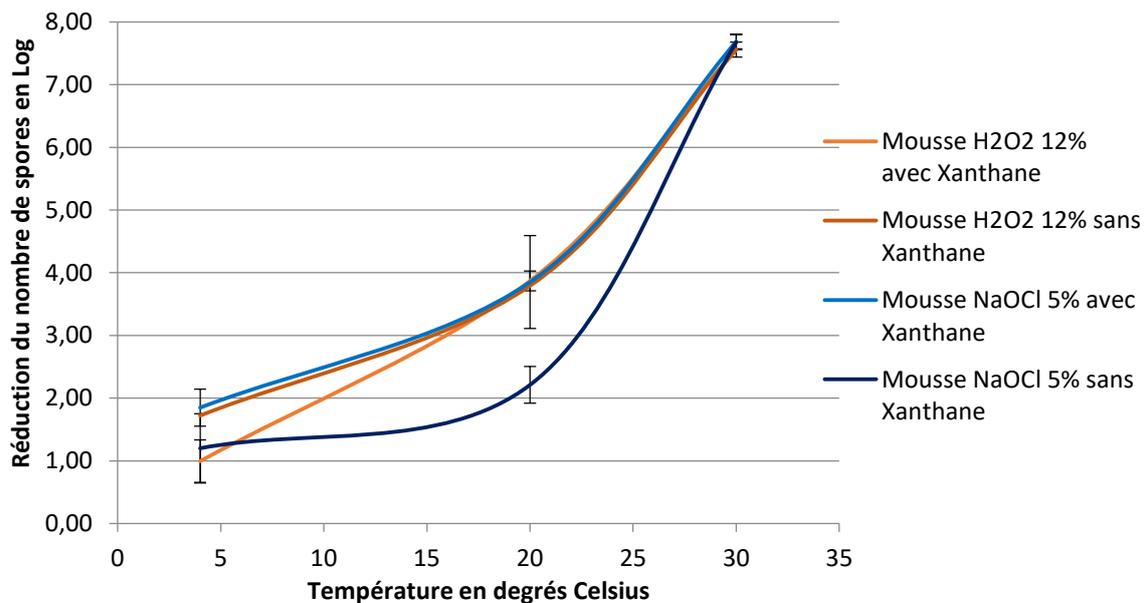


Figure 64. Comparaison de la réduction du nombre de spores en log sur le support à 4°C, 20°C et 30°C pour les mousses H₂O₂ à 12% et NaOCl 5% avec et sans Xanthane en 25 minutes de temps de contact

Cette augmentation semble s'accélérer pour l'ensemble des mousses entre 20°C et 30°C. De plus, la vitesse de décontamination de la mousse NaOCl sans Xanthane ne dépend pas de la température de la même façon que les trois autres mousses. Il est donc possible que les propriétés de drainage des mousses varient en fonction de la température. Pour répondre à cette question des essais avec le Foamsan ont donc été réalisés en complément de ceux présentés dans la partie 3.1.3.2. Cependant, techniquement il n'a pas pu être possible de faire les essais à 4°C donc seules les cinétiques de drainage des mousses NaOCl, H₂O₂ et neutre à 30°C ont été opérées.

Nous constatons que les mousses NaOCl sans Xanthane à 30°C retournent à l'état liquide en 27 minutes alors qu'à 20°C cela prenait 33 minutes. Les mousses neutres et H₂O₂ drainent totalement entre 12 et 14 minutes au lieu de 17 minutes à 20°C. Les mousses sans

Xanthane ne présentent pas de différence significative de vitesse de drainage ($p\text{-value} > 0,05$) (Figure 65).

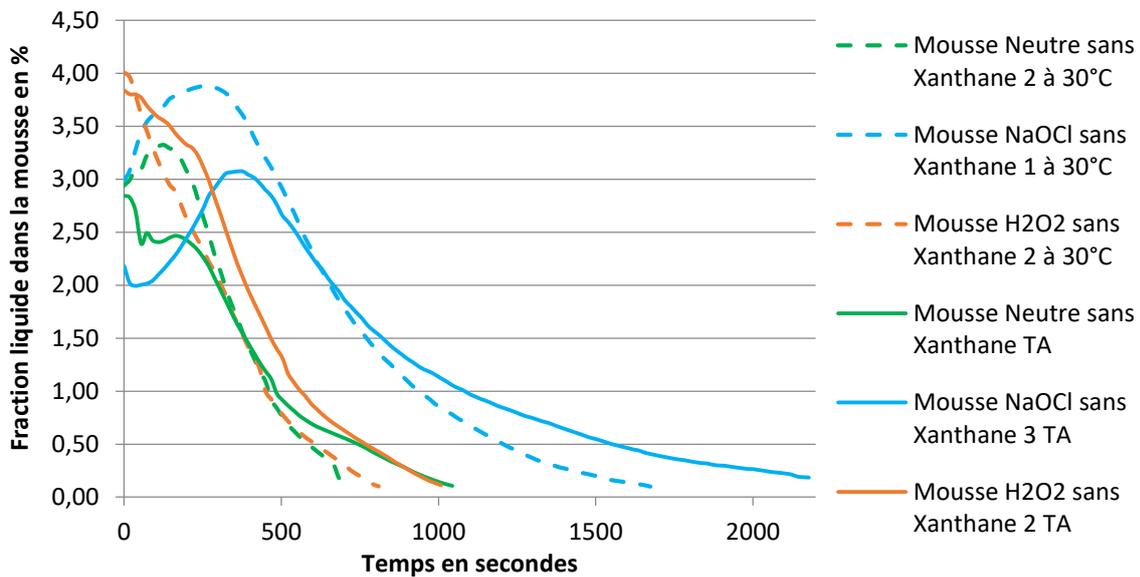


Figure 65. Comparaison du drainage à 20°C et 30°C des mousses NaOCl, H₂O₂ et neutre ne contenant pas de Xanthane, grâce à un appareil Foamscan

En présence de Xanthane le retour à l'état liquide de la mousse NaOCl prend 57 minutes, pour la mousse H₂O₂ 148 minutes et 212 minutes pour la mousse neutre à 30°C (Figure 66).

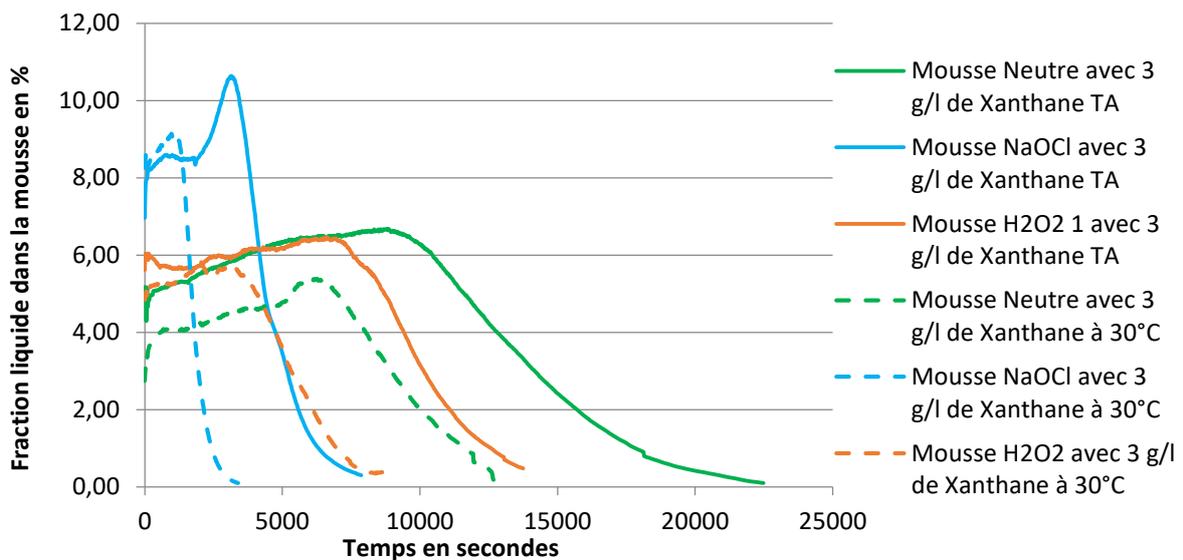


Figure 66. Comparaison du drainage à 20°C et 30°C des mousses NaOCl, H₂O₂ et neutre contenant du Xanthane à 3 g/L, grâce à un appareil Foamscan

Comparé à ces résultats, le drainage des mêmes mousses à 20°C est de 132 minutes pour la mousse NaOCl, 233 minutes pour la mousse H₂O₂ et 345 minutes pour la mousse neutre. Un retard au drainage est observé pour les trois mousses. A 30°C ; il est de 21 minutes pour la mousse NaOCl, 58 minutes pour la H₂O₂ et 117 minutes pour la neutre. Ce retard au drainage est significativement plus court que celui à 20°C.

Ces résultats montrent que le retard au drainage diminue en durée quand la température est augmentée mais que celle-ci n'influence pas la vitesse du drainage. Ainsi, la mousse va amorcer son drainage plus rapidement à 30°C qu'à 20°C mais ensuite sa vitesse sera la même qu'à 20°C (Figure 58 et Figure 66). Il est donc possible qu'à 30°C les mousses perdent en viscosité par la destruction d'une partie du Xanthane dans la mousse. Le drainage est alors plus rapidement amorcé, ce qui permet le renouvellement du désinfectant plus tôt à l'intérieur du film de mouillage par effet de ruissellement. De plus, ce flux de liquide de drainage s'écoulant le long de la paroi du support contribue au détachement des spores qui sont neutralisées à l'intérieur de la mousse.

Les résultats d'efficacité de décontamination des solutions liquides H₂O₂ mettent en évidence l'amélioration de l'efficacité de décontamination par l'accélération de la vitesse des réactions chimiques par la température. En effet, il a déjà été démontré que la réaction chimique entre le désinfectant et les spores est accélérée lors de l'augmentation de la température. Or, en regardant les mêmes résultats mais cette fois sous forme de mousse, nous constatons une amélioration plus importante de l'efficacité de décontamination comparée à celle avec les solutions liquides. Il existe donc un phénomène de plus que celui de l'accélération de la vitesse des réactions chimiques par l'élévation de la température (Kissinger 1957). Ce phénomène serait justement la diminution du retard au drainage par les mousses à 30°C.

En conclusion, cette diminution du retard de drainage, associée à l'augmentation de la vitesse d'une réaction lorsque la température augmente, permet la décontamination de l'ensemble des spores à 30°C par les deux mousses.

Enfin, nous avons déterminé grâce aux résultats d'efficacité de décontamination à 4°C, 20°C et 30°C, si les cinétiques de décontamination des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% avec et sans Xanthane suivent la loi d'Arrhenius (Figure 67).

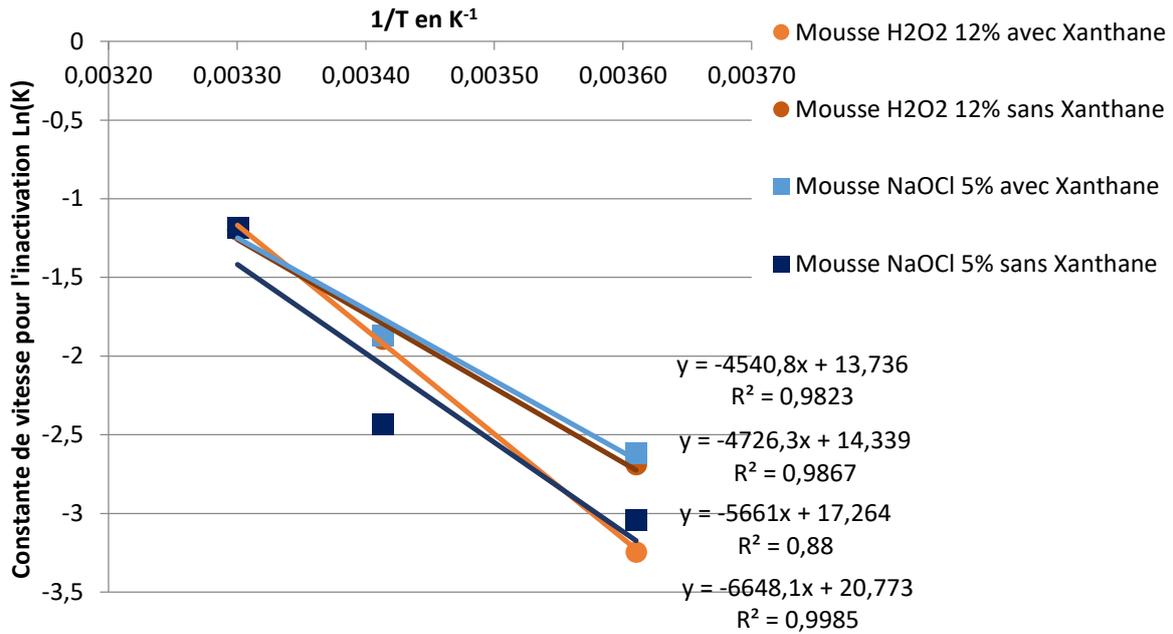


Figure 67. Etude de la loi d'Arrhenius en fonction de la température et de la constante d'inactivation des spores par les mousses H₂O₂ 12% et NaOCl 5% avec ou sans Xanthane

Sur ce graphique plus les coefficients de détermination (R^2) se rapproche de 1 plus la cinétique de décontamination de la mousse suit la loi d'Arrhenius (Moats, 1971). Les résultats montrent que les mousses H₂O₂ contenant ou non du Xanthane suivent correctement la loi d'Arrhenius (respectivement $R^2=0,998$ et $0,986$). Pour les mousses NaOCl, seule la mousse contenant du Xanthane a un coefficient de détermination proche de 1 ($R^2=0,986$). La mousse NaOCl sans Xanthane a un R^2 de $0,88$. Ainsi, il est possible que seule la mousse NaOCl contenant du Xanthane suive la loi d'Arrhenius. Or, pour les mousses dont la réaction de décontamination suit la loi d'Arrhenius, il est possible de calculer le temps nécessaire à chaque température pour décontaminer une quantité ciblée en spores (7 logs par exemple) (Sagripanti and Bonifacino 1996). Ainsi, il faudrait maintenir un temps de contact minimum entre la mousse et les spores de 96 minutes avec NaOCl 5% contenant du Xanthane et 180 minutes pour celle H₂O₂ 12% pour décontaminer 7 logs de spores de Bt à 4°C. Cependant, les essais avec la mousse NaOCl à 2,5% ont montré qu'en passant à un temps de contact d'une heure la réduction du nombre de spores par cette mousse n'est pas améliorée. Il est donc possible que ce temps doit être augmenté de plusieurs heures. L'étude de Amoaka et al. (2013) a démontré qu'un temps de contact de 24 heures à cette température permet la

décontamination de plus de 6 logs de spores de *Bacillus anthracis* par des solutions liquides de peroxyde d'hydrogène à 4,5%.

L'application de la loi d'Arrhenius pour les mousses à 20°C met en évidence que les deux mousses ont besoin d'être en contact environ 45 minutes avec le support contaminé pour une décontamination de 7 logs. Pour la mousse NaOCl cette hypothèse ne correspond pas aux résultats des essais d'efficacité de décontamination. Il est cependant difficile d'évaluer le temps nécessaire à la décontamination de 7 logs de spores par cette mousse car les résultats des comptages sont très disparates entre 15 minutes et 25 minutes. Le coefficient de détermination R^2 du graphique (Figure 67) pour ces mousses a donc pu être sous-estimé. Cette disparité de résultats à 20°C pourrait aussi expliquer pourquoi la cinétique de décontamination de la mousse NaOCl 5% sans Xanthane ne suit pas bien la loi d'Arrhenius. L'application de la loi d'Arrhenius dans le calcul du temps de contact est cohérente avec les résultats des essais d'efficacité de décontamination pour la mousse H₂O₂ à 20°C. En effet, il faut effectivement un maximum de 45 minutes pour décontaminer 7 logs de spores de Bt avec cette mousse. Les essais sur le Foamscan ont permis de déterminer que le drainage débute après les 45 minutes de contact nécessaires pour les 7 logs de décontamination (retard au drainage des mousses à 20°C est de 57 minutes pour NaOCl et 122 minutes pour H₂O₂).

En conclusion, en utilisant la loi d'Arrhenius, il est possible d'ajuster le temps de contact en fonction de la température ambiante pour une meilleure utilisation de la mousse, par exemple pour décontaminer un véhicule dans un garage où la température ambiante est différente selon la saison (Andersen, Rasch et al., 2006). Ce temps de contact peut être surestimé afin d'assurer la décontamination des 7 logs de spores car la présence de l'agent gélifiant (Xanthane) permet la stabilité de la mousse en remplissage sur une longue période (plusieurs heures). Si à 4°C une augmentation du temps de contact ne suffit pas à atteindre une réduction du nombre de spores égale à 7 logs, il est alors conseillé de procéder à l'application des mousses plusieurs fois sur les surfaces contaminées.

Enfin, l'ensemble de ces résultats est cohérent avec ceux provenant d'études sur d'autres produits désinfectants sous forme liquide dont l'hypochlorite de sodium (Guan, Chan et al., 2013). Mais à notre connaissance c'est la première fois que des mousses contenant ces désinfectants sont étudiées à ces températures et en remplissage. De plus, la plupart des études basées sur les procédés de décontamination des liquides et des mousses indiquent soit

une fourchette de températures soit que les essais se déroulent à température ambiante (Young and Setlow, 2004, Rogers, Sabourin et al., 2005, Ryan, Lee et al., 2014, Eryilmaz, Kaskatepe et al., 2016). Pour certaines études, la température d'essai n'est même pas précisée (Andersen, Rasch et al., 2006, Gonzalez, Nandy et al., 2015) alors que des articles conseillent de prendre en compte ce paramètre dans l'évaluation de l'efficacité de décontamination des désinfectants (Russell, 1990). Une étude de Wood et al. compare l'efficacité de divers produits commerciaux sporicides en indiquant que la température ambiante se situe entre 20 et 25°C (Wood, Choi et al., 2011). Or, notre étude a permis de valider que la température est un paramètre important à prendre en compte dans l'évaluation de l'efficacité de décontamination des désinfectants. Cette température doit donc être prise en compte au cours de l'utilisation de désinfectants à différentes températures, notamment lors de la décontamination des sites extérieurs. L'influence de la température sur leur efficacité de décontamination est donc un paramètre à mesurer voire à réguler lors des essais.

3.1.3.4. Efficacité de décontamination suite à l'immersion d'un support contaminé avec des spores et salis par des substances interférentes dans la mousse (protocole R_{sali})

Précédemment, l'évaluation de la décontamination des mousses en présence de substances interférentes a été réalisée sur des supports en position horizontale. Or, les essais de cinétique de décontamination en remplissage ont permis de mettre en évidence un possible impact de cette mise en œuvre sur la vitesse d'efficacité de décontamination. Nous avons donc poursuivi les expérimentations avec les substances interférentes en utilisant le protocole R_{sali}. Les essais ont été réalisés afin d'évaluer l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% en présence de spores déposées sur de la BSA séchée sur un support immergé en position verticale dans la mousse (Figure 68).

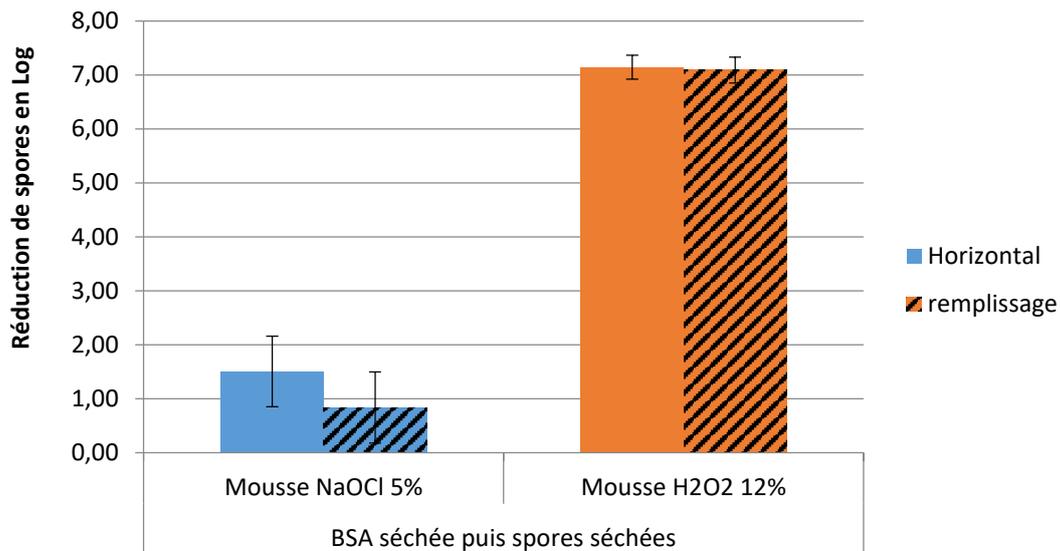


Figure 68. Efficacité de décontamination en réduction de log des mousses NaOCl 5% et H₂O₂ 12% avec 3 g/L de Xanthane remplissant un tube contenant un support en position verticale contaminé par des spores de Bt et salis par de la BSA séchée.

Ces essais complètent ceux déjà réalisés en position horizontale. La décontamination du support en remplissage est de $0,83 \pm 0,66$ log pour la mousse NaOCl 5% en 1 heure et de $7,09 \pm 0,24$ log pour celle H₂O₂ 12%. Il n'y a pas de différence de résultats entre les essais en position horizontale et ceux en remplissage (p-value > 0,05). Le passage du support en position verticale dans la mousse n'influence pas l'efficacité de décontamination des mousses en présence de BSA.

En conclusion, la mise en œuvre de la mousse par remplissage ne modifie pas l'efficacité de décontamination des mousses. Ainsi, l'utilisation de la mousse sur une paroi horizontale et verticale pour décontaminer 7 logs de spores de Bt en présence de sang séché est possible par la mousse H₂O₂ 12% mais pas avec celle contenant NaOCl 5%.

3.1.4. Conclusion de l'étude de l'efficacité de décontamination des mousses biocides sur les spores bactériennes suivant les différentes mises en œuvre

Cette étude sur les spores a permis de déterminer et de discuter l'efficacité de décontamination biologique des mousses suivant différents protocoles expérimentaux. Les protocoles développés se veulent représentatifs des différentes mises en œuvre sur le terrain lors de contaminations accidentelles ou intentionnelles : pulvérisation au sol ; talochage et pulvérisation sur les murs ; remplissage de pièces entières (murs et sols). Pour chaque protocole, deux agents biocides ont été testés sous forme de mousse, l'hypochlorite de sodium et le peroxyde d'hydrogène.

La mousse avec Xanthane (3 g/L) contenant 5 % d'hypochlorite de sodium permet une décontamination rapide de 7 logs de spores de Bt en 30 minutes pour chacune des trois voies de mise en œuvre à 20°C. En plus de ces efficacités, cette mousse permet la décontamination de 6 logs de spores de Gs sur l'ensemble des supports en 30 minutes, ainsi que la réduction de 7 logs de spores de Bt en présence d'argile. Seuls le support en mortier avec les spores de Bt et la présence de matière organique séchée comme la BSA et l'huile de moteur, diminuent cette efficacité. En effet, le mortier est un matériau poreux connu pour être difficile à décontaminer car les spores se logent dans les porosités et deviennent moins accessibles aux désinfectants. La matière organique est considérée comme un inhibiteur de l'hypochlorite de sodium et l'huile de moteur comme une barrière empêchant la diffusion des désinfectants. De plus, des essais sans supports ont permis de valider l'utilisation de la mousse NaOCl 5% pour la décontamination des spores présentes en suspension dans l'air. Enfin, la décontamination des spores de Bt en remplissage par la mousse NaOCl à 30°C permet de décontaminer plus de 7 logs de spores, ce qui n'est pas le cas à 4°C.

La mousse avec Xanthane contenant 12% de peroxyde d'hydrogène entraîne une diminution de 7 logs de spores Bt sur l'aluminium, le polystyrène et la faïence, en position horizontale en 30 minutes à 20°C. Elle nécessite une dizaine de minutes de plus pour garantir la neutralisation totale des spores en position verticale et en remplissage. De plus, à l'inverse de la mousse NaOCl, la mousse H₂O₂ permet d'atteindre une réduction de plus de 7 logs de spores de Bt en présence de matière organique séchée sur paroi horizontale ou verticale. En présence de spores de Gs, la mousse H₂O₂ ne permet pas la décontamination des 6 logs de spores présentes sur les supports en 30 minutes. Les spores de Gs sont reconnues comme plus

résistantes aux traitements chimiques et physiques que celles de Bt surtout pour les traitements avec le peroxyde d'hydrogène. De même, cette mousse n'entraîne pas la décontamination de 7 logs de spores de Bt sur les supports en présence d'argile ou d'huile de moteur, ainsi que les spores de Bt libres au sein de la mousse en 30 minutes. Enfin comme pour la mousse NaOCl, la décontamination des spores de Bt en remplissage à 30°C est supérieure à 7 logs mais ne dépasse pas les 2 logs à 4°C.

Nous avons aussi pu mettre en évidence que le film de mouillage formé par les mousses sur les supports en position horizontale, verticale et remplissage est suffisamment stable et recouvrant pour permettre une décontamination rapide des spores adhérentes à la paroi. En position horizontale, le film de mouillage peut être alimenté en désinfectant lors de l'écoulement du liquide de drainage des couches de mousse supérieure par les bords de Plateau. Dans notre étude, le drainage des mousses contenant du Xanthane commence après 60 minutes. Le drainage des mousses à 3 g/L de Xanthane n'est pas nécessaire pour obtenir une excellente décontamination (réduction de spores > 7 logs). Ainsi, le film de mouillage formé instantanément au moment de l'application des mousses est suffisamment recouvrant et la réaction immédiate pour assurer la décontamination de 7 logs de spores de Bt en environ 30 minutes.

En position verticale, le désinfectant dans le film de mouillage est renouvelé par le ruissellement du film de mouillage de la mousse le long de la paroi. En présence de Xanthane les mousses (5,5% de fraction liquide) glissent le long de la paroi verticale (environ 1 cm/min) et favorisent l'entraînement des spores dans la mousse. Après glissement de la mousse, le film de mouillage est suffisamment épais pour permettre la décontamination de 7 logs en environ 30 minutes avant de sécher totalement. En absence de Xanthane, les mousses (3,5% de fraction liquide) s'évaporent avant les 30 minutes. La décontamination des supports est totale même après évaporation des mousses sur la paroi verticale. Il est donc possible que le film de mouillage soit assez stable et la décontamination suffisamment rapide pour que les spores soient entièrement inactivées avant l'évaporation de la mousse et de son film de mouillage. L'évaporation se fait en deux phases : une première où la mousse s'évapore sans modifier le film de mouillage ; puis une seconde partie où le film de mouillage laissé à l'air libre après l'évaporation totale de la mousse s'amincit et disparaît. Il est aussi possible que l'évaporation

concentre le biocide sur la contamination permettant une décontamination plus durable et rapide des spores.

En remplissage, en plus du ruissellement du film de mouillage, le renouvellement du biocide est possible par le transfert du liquide du cœur de la mousse vers la paroi. Dans notre étude, le drainage des mousses contenant du Xanthane commence après 60 minutes. Ainsi, la quantité initiale de biocide dans le film de mouillage lors de la mise en contact de la mousse et du support, ainsi que celle renouvelée par le ruissellement du film de mouillage suffisent pour assurer la décontamination de 7 logs de spores en 30 minutes pour NaOCl et 45 minutes pour H₂O₂. Une partie des spores est aussi transférée dans la mousse où elle est décontaminée. Les résultats obtenus lors des essais en remplissage sont proches de ceux obtenus par talochage de la mousse sur parois verticales.

Nous avons aussi observé l'impact du Xanthane sur la stabilité des mousses dans le temps ainsi que sur l'efficacité de décontamination. Le Xanthane (3 g/L) contribue à l'augmentation de la stabilité de la mousse en retardant son drainage de une à deux heures suivant la formulation. Ce retard contribue à assurer le temps de contact entre la mousse et la contamination.

Sur les spores libres la mousse NaOCl contenant du Xanthane est plus efficace que celle n'en contenant pas. Cette amélioration de l'efficacité de décontamination par l'apport de Xanthane serait due au « piégeage » accru des spores dans les films de liquide plus stables de la mousse. Les spores sont alors plus accessibles pour le désinfectant. De même, lors du traitement en remplissage sur les spores adhérentes à la paroi verticale, la cinétique de décontamination semble plus rapide en présence de Xanthane. En remplissage, le film de mouillage de la mousse est plus stable grâce à l'ajout de Xanthane. La concentration en Xanthane n'est pas en excès et permet quand même le drainage de la mousse après quelques heures, facilitant la récupération des effluents après traitement. L'utilisation des mousses contenant du Xanthane est donc adaptée à la décontamination d'infrastructure en remplissage.

Cette étude permet également de dégager quelques conseils et recommandations à connaître lors de l'utilisation des mousses pour décontaminer les spores. Dans un premier temps, nous avons pu mesurer l'impact de la température sur l'efficacité de décontamination

des mousses. Une augmentation de la température améliore cette efficacité, alors qu'au contraire le déploiement des mousses à des températures autour de 4°C limite la neutralisation des spores. Les cinétiques de décontamination des mousses H₂O₂ suivant la loi d'Arrhenius, le temps de contact lors du déploiement de celles-ci en extérieur peut être estimé et adapté à la température ambiante. Il est donc possible d'ajuster le temps de contact en fonction de la température ambiante pour une meilleure utilisation de la mousse. De plus, ce temps de contact peut être surestimé afin de s'assurer de la décontamination des 7 logs de spores car la présence de l'agent gélifiant (Xanthane) permet la stabilité de la mousse en remplissage sur une longue période (plusieurs heures). Cependant, il est possible qu'à des températures trop basses comme 4°C, une augmentation du temps de contact de quelques heures ne suffise pas pour atteindre une réduction de 7 logs du nombre de spores. Il est alors conseillé de procéder à l'application d'une seconde couche de mousse sur les surfaces contaminées à cette température afin de garantir la décontamination d'au moins 7 logs de spores. Pour la mousse H₂O₂, l'augmentation du temps de contact au-delà de 30 minutes permettrait certainement de s'assurer de la décontamination totale des supports en verre et en acier inoxydable, ainsi que lors du talochage de la mousse sur les parois verticales.

Enfin, en présence de substances interférentes comme de la matière organique, de la terre ou de l'huile, nous recommandons un premier nettoyage avec un détergeant/dégraissant. Le désinfectant contenu dans les mousses appliquées après ce nettoyage aurait alors accès à la contamination. Malgré ce pré-nettoyage par un procédé liquide ou de lingettes imprégnées, une quantité d'effluents par l'utilisation des mousses comme biocide restera inférieure à celle générée par l'utilisation d'une solution liquide de décontamination. De plus, comme nous l'avons vu lors de ces essais, les spores transférées dans la mousse sont entièrement décontaminées en 25 minutes laissant les effluents après traitement exempts de contamination. Ainsi, les effluents générés à la suite de ce traitement peuvent donc être considérés comme non contaminés après ce laps de temps.

Afin de compléter les recommandations que nous pouvons faire à de futurs industriels, des essais d'évaluation des performances de décontamination des mousses après vieillissement des solutions moussantes ont été réalisés (Annexe 2). En conclusion de ces essais, nous avons constaté qu'un stockage des solutions liquides prêtes à l'emploi à 4°C est possible pour la solution H₂O₂ mais pas pour celle contenant NaOCl. A cette température et à

40°C, il existe une détérioration rapide du Xanthane et du Glucocon® au cours du temps dans la solution liquide NaOCl qui n'est pas due à la dégradation naturelle observable lors du stockage à température ambiante pour les solutions neutre et H₂O₂. De fait, l'utilisation d'une solution prête à l'emploi contenant l'ensemble des produits est difficilement envisageable avec NaOCl. Il est donc envisagé un stockage séparé entre les désinfectants et les additifs et leur mélange au moment de leur utilisation. Les résultats de ces essais avec la solution neutre permettent d'envisager le stockage du Glucocon® et du Xanthane dans une même solution. Cependant, nous conseillons un stockage de l'ensemble des produits à 4°C afin d'éviter la dégradation des additifs après un temps de stockage supérieur à 4 mois.

L'ensemble de ces essais sur les spores n'a pas permis de discriminer significativement une mousse biocide par rapport à une autre. La mousse NaOCl semble plus rapide en termes d'efficacité mais son inhibition en présence de matière organique oriente vers l'utilisation de la mousse H₂O₂ dans les milieux de l'agroalimentaire et de l'hospitalier. Afin de préparer l'étude sur l'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms, nous avons réalisé des essais suivant les normes EN 13697 : 2001 et EN 13704 (Annexe 3). Ces essais ont permis d'évaluer l'efficacité de décontamination des mousses sur des bactéries végétatives (*Salmonella enterica typhimurium*, *Enterococcus hirae* et *Staphylococcus aureus*). En conclusion de ces essais, nous avons mis en évidence que la mousse NaOCl permet la décontamination en 5 minutes de la totalité des bactéries végétatives présentes sur les supports. A l'inverse la mousse H₂O₂ ne permet pas la décontamination totale des bactéries sécrétant de la catalase. Ainsi, nous avons pu constater une très forte perte d'efficacité de la mousse H₂O₂ en présence de bactéries dites catalase positives. Cependant, le temps de contact indiqué dans la norme étant de 5 minutes, il est possible qu'une augmentation du temps de contact ou de la concentration en H₂O₂ puisse améliorer l'efficacité de décontamination de cette mousse sur les bactéries sécrétrices de catalase.

Dans la partie suivante, nous allons continuer à étudier le comportement des mousses biocides sur une autre forme de résistance bactérienne, les biofilms, en prenant en compte les conclusions dégagées de l'étude sur les spores ainsi que sur les bactéries végétatives.

3.2. Etude des mécanismes d'action biocide des mousses biocides sur les biofilms bactériens

A la suite de l'étude menée sur les spores bactériennes, nous avons évalué l'efficacité de décontamination de nos mousses sur une autre forme de résistance, les biofilms. Cette nouvelle étude exploratoire commence par l'adaptation du protocole de formation et d'observation des biofilms, avant de pouvoir débiter l'évaluation de l'efficacité de décontamination de nos mousses sur cette forme de résistance.

3.2.1. Adaptation du protocole de culture et d'observation des biofilms

Avant d'évaluer l'efficacité de décontamination des mousses sur des biofilms bactériens, nous avons dû adapter un protocole initial de synthèse de biofilms. Les résultats sont présentés en fonction des configurations testées. Le choix d'une technique se fait sur plusieurs critères : son optimisation du nombre de bactéries récupérées et sa simplicité de mise en œuvre.

3.2.1.1. Choix de la technique de lavage et de la technique de détachement du biofilm

Dans un premier temps deux techniques de lavage et deux techniques de détachement du biofilm ont été comparées (An and Friedman, 1997). Les deux techniques de lavage étudiées sont le lavage en flux et celui en bain. Pour le détachement du biofilm les techniques de sonication et d'agitation sont comparées (Figure 69).

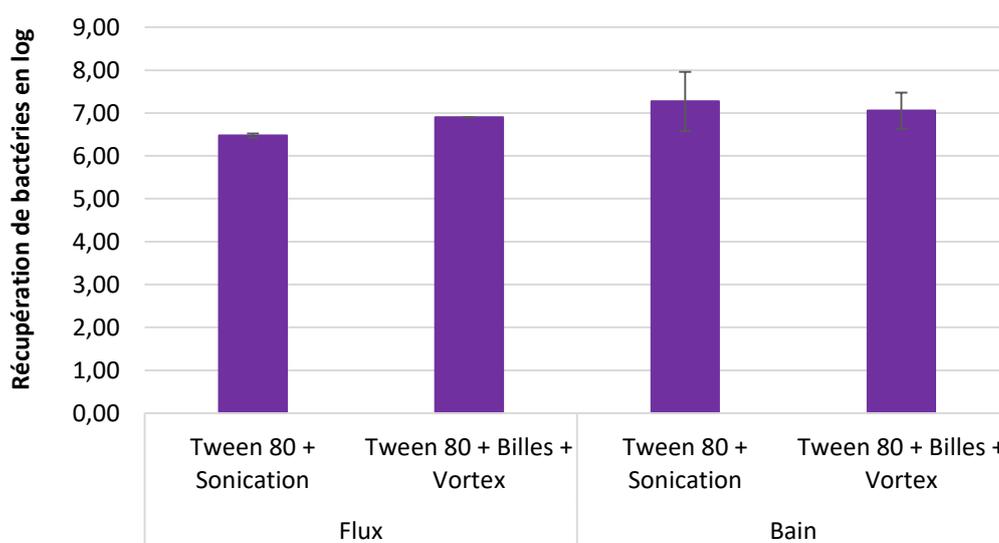


Figure 69. Comparaison de la récupération de bactéries en fonction de deux techniques de détachement et de lavage sur des biofilms formés sur des lamelles en boîte de Petri

En moyenne la récupération est de $7,18 \pm 0,51$ log de bactéries pour le lavage en bain et de $6,70 \pm 0,24$ log de bactéries pour le lavage en flux. Pour le détachement, les résultats montrent que la récupération du biofilm par agitation est supérieure à celle par sonication avec le lavage en bain. La récupération est de $7,00 \pm 0,50$ log de bactéries par agitation et de $7,03 \pm 0,50$ log de bactéries par sonication. Ces résultats de récupération de bactéries ne permettent pas de discriminer totalement une technique de lavage ou de détachement plus qu'une autre. Nous avons donc privilégié le côté pratique de ces techniques pour déterminer quel lavage et quel détachement seront appliqués pour la suite des essais. Pour la technique de lavage celle en bain est plus facile à mettre en œuvre. De même, pour le détachement des biofilms, la technique d'agitation par vortex est plus rapide à mettre en place et à effectuer. Par ailleurs, si le bain de sonication est trop puissant et/ou trop long, certaines bactéries composant le biofilm risquent d'être détruites et par conséquent de biaiser nos résultats.

En conclusion, les techniques privilégiées sont donc celle en bain pour le lavage et celle par l'agitation avec les billes en verre pour le détachement.

3.2.1.2. Choix du support

Il est primordial d'utiliser un support adapté à l'observation des biofilms au microscope et lors de leur récupération pour le comptage. Ainsi, différents supports ont été testés afin de déterminer lequel contribue à une meilleure formation du biofilm et facilite sa récupération (Figure 70).

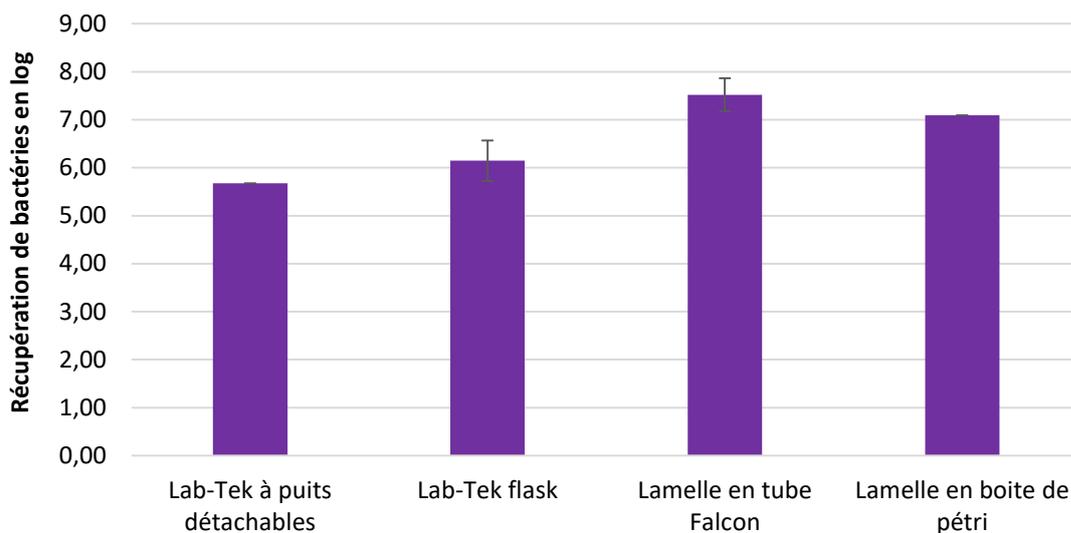


Figure 70. Comparaison de la récupération des bactéries d'un biofilm de PA14 de 24h en fonction des quatre supports étudiés

Ces essais ont été réalisés avec quatre supports recouverts de bactéries : une lamelle en verre dans une boîte de Petri ; une lamelle en verre dans un tube Falcon® ; une Lab-Tek® à puits détachables et une Lab-Tek flask®. Les biofilms sont formés à partir de bactéries PA14 en 24h avec le lavage en bain et le détachement par agitation. Pour les lamelles en verre placées dans la boîte de Petri, la récupération est de $7,09 \pm 0,00$ log en bactéries et de $7,52 \pm 0,34$ log pour celles en tube Falcon®. Les essais avec les Lab-Teks flask® ont en moyenne de $6,15 \pm 0,42$ log de bactéries et de $5,68 \pm 0,00$ log pour les Lab-Teks® à puits détachables. Nous avons privilégié le support le plus simple à manipuler malgré une quantité de bactéries récupérées sensiblement plus faible. En effet, avec la lamelle en verre dans les boîtes de Petri, le biofilm peut se développer sur et sous la lamelle. Elles deviennent alors difficiles à récupérer sans abimer les biofilms. Pour les essais avec les lamelles en verre dans le tube Falcon®, ils sont difficilement réalisables techniquement. Il y a de nombreuses manipulations à faire et de précautions à prendre pour que la solution bactérienne ne coule pas dans le tube Falcon® et reste sur la lamelle. A l'opposé les Lab-Teks® à puits détachables comme celles à flasque, sont très faciles à manipuler permettant de minimiser le risque de contamination. De plus, le lavage peut être effectué directement dans les puits et flasques. Après le lavage, il est possible de détacher la flasque et d'utiliser directement la lame pour la récupération. Lors des comptages, nous pouvons ainsi distinguer les bactéries restantes sur le support de celles transférées dans la mousse. Pour l'observation des biofilms au microscope se sont les Lab-Teks® à puits qui seront utilisées.

En conclusion, les Lab-Tek flask® sont privilégiées comme support de formation des biofilms pour les comptages et celles à puits pour l'observation en microscopie.

3.2.1.3. Choix de la souche

Deux souches bactériennes sont utilisées pour générer des biofilms sur les Lab-Teks® : *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) et *Pseudomonas fluorescens* (MF37). Nous avons donc évalué leur performance à former des biofilms avec notre protocole afin de déterminer laquelle de ces espèces sera utilisée lors des essais avec les mousses (Figure 71).

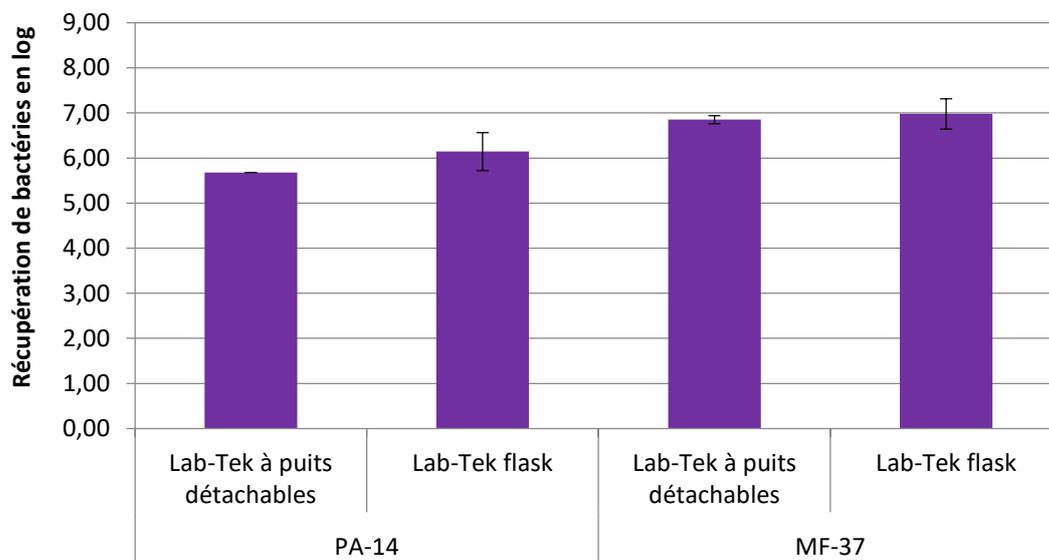


Figure 71. Comparaison de la récupération des bactéries d'un biofilm de PA14 et MF37 en fonction de deux supports Lab-Teks® à puits détachable ou flask

Les résultats montrent un nombre de bactéries PA14 récupérées équivalent à 5,91 logs et 6,92 logs de bactéries de MF37 sur Lab-Tek® à puits. Avec les Lab-Teks flask® les résultats tendent aussi à un nombre plus important de bactéries MF37 présent sur le support par rapport à PA14 (respectivement $6,98 \pm 0,33$ log et $6,15 \pm 0,42$ log). Les biofilms de PA14 sont plus épais que ceux en MF37. De plus, MF37 présente une auto-fluorescence verte par le plasmide GFP inséré. Cette fluorescence pourrait interférer lors des observations avec celle de la coloration du kit Live/Dead (Figure 72).

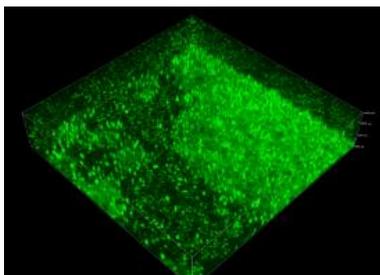


Figure 72. Biofilm de 24h formé en Lab-Tek® à puit à partir de bactéries de PA14 (images 3D acquises en microscopie confocale (excitation à 488 nm))

En conclusion, les essais seront réalisés avec la souche PA14 grâce à sa capacité à former des biofilms plus épais et n'ayant pas d'auto-fluorescence par GFP.

3.2.1.4. Choix des conditions de formation du biofilm

L'optimisation de la formation des biofilms repose sur le milieu nutritif utilisé ainsi que sur la température et le temps d'incubation (*Parsek and Tolker-Nielsen, 2008*). Douze conditions différentes de formation du biofilm de PA14 sur des Lab-Teks flask® ont été testées et évaluées par l'utilisation de la microscopie à fluorescence. Pour déterminer quelles conditions seront appliquées lors des essais avec les mousses, les biofilms doivent répondre à certains critères visuels et techniques. Ces critères sont basés sur l'épaisseur, la surface de recouvrement du support, l'aspect structurel (forme champignon), ainsi que la praticité de mise en œuvre au niveau technique et le risque d'avoir beaucoup de bactéries mortes. L'ensemble des résultats de ces essais est reporté dans le Tableau 5 ci-dessous :

Composition du milieu	T°C	Temps	Respect des critères	Interprétations
Milieu TSB	25°C	24 h	× non recouvrant et peu épais	Le milieu est trop riche en nutriment et ne stresse pas suffisamment les bactéries
		48h		
Milieu TSB dilué à 1/10	25°C	24 h	× non recouvrant, peu épais (6 à 7 µm) et sans structure champignon	La quantité de nutriments dans le milieu induit un stress suffisant aux bactéries pour former un biofilm
		48h	✓ recouvrant, épais (10 à 12µm), structure en champignon et facile techniquement à mettre en place	
Milieu TSB dilué à 1/10 + Tween 80 à 0,1%	37°C	24 h	× absence de biofilm	Le Tween 80 ne permet pas d'obtenir des biofilms avec une plus grande biomasse bactérienne dans notre étude (Nielsen, Kjems et al. 2016)
		48h	✓ épais × non recouvrant	
Tampon PBS	37°C	24 h	✓ recouvrant × peu épais (3 à 4 µm)	Le milieu ne contient pas de nutriments ce qui est trop contraignant pour les bactéries. L'augmentation du temps d'incubation ne permet pas d'augmenter l'épaisseur du biofilm
		48h		
Milieu TSB	25°C	24h puis retrait milieu puis 24h	× non recouvrant	Le risque de mortalité est important au sein du biofilm. De plus, ces protocoles sont techniquement plus contraignants (retrait du milieu)
Milieu TSB dilué à 1/10			✓ recouvrant et épais (6 et 7 µm)	
Sans milieu	25°C	48h	✓ recouvrant × peu épais	Seules les bactéries présentes pendant la phase d'adhésion sont toujours visibles

Tableau 5. Résultats des observations en microscopie à fluorescence et confocale des biofilms suivant différents protocoles de formation (x : critères non respectés et ✓ : critères respectés)

L'ensemble de ces résultats a permis de déterminer les conditions les plus propices à la formation du biofilm (Figure 73) :

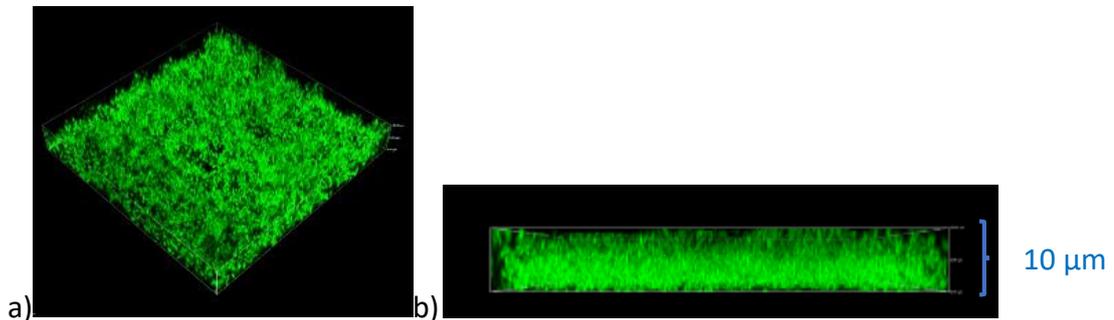


Figure 73. Biofilms de bactéries PA14 marquées au Syto-9 ; images 3D (a) et axe X (b) acquises à partir de la microscopie confocale

- Milieu TSB à 1/10^{ème}
- Température de 25°C
- Durée d'incubation de 48h

Pour compléter ces essais, nous avons réalisé le comptage des bactéries présentes au sein du biofilm après 24h, 48h et 72h de formation. Les durées d'incubation de 48h et de 72h permettent de réaliser des biofilms contenant un nombre en bactéries supérieur à 7 logs, (respectivement de $7,61 \pm 0,35$ log et de $8,23 \pm 0,14$ log) ce qui n'est pas le cas en 24h ($6,15 \pm 0,42$ log). La réalisation des biofilms en 72h permet donc d'avoir plus de 7 logs en bactéries et de les laisser incuber le weekend, la majorité des essais seront réalisés avec ce temps de formation.

3.2.1.5. Mise au point de la technique de dépôt des microorganismes pour effectuer les comptages bactériens

Le dépôt des bactéries sur les boîtes de Petri peut avoir un impact sur leur développement avant comptage. Par exemple, pour les essais avec les spores, leur dépôt est réalisé au fond de la boîte de Petri puis le milieu nutritif de LB contenant de l'agar est coulé par-dessus. Des essais préliminaires ont mis en doute l'utilisation de cette méthode avec les bactéries végétatives. En effet, il a été constaté qu'en inclusion elles se développent plus difficilement, rendant les colonies difficiles à compter. Nous avons donc étudié différentes techniques de dépôt sur boîtes de Petri avec les bactéries PA14. Ces techniques sont : le

séchage de 1mL de la dilution sur du LB agar gélosé et l'étalement au râteau de 100µL de la dilution sur du LB agar gélosé (Figure 74).

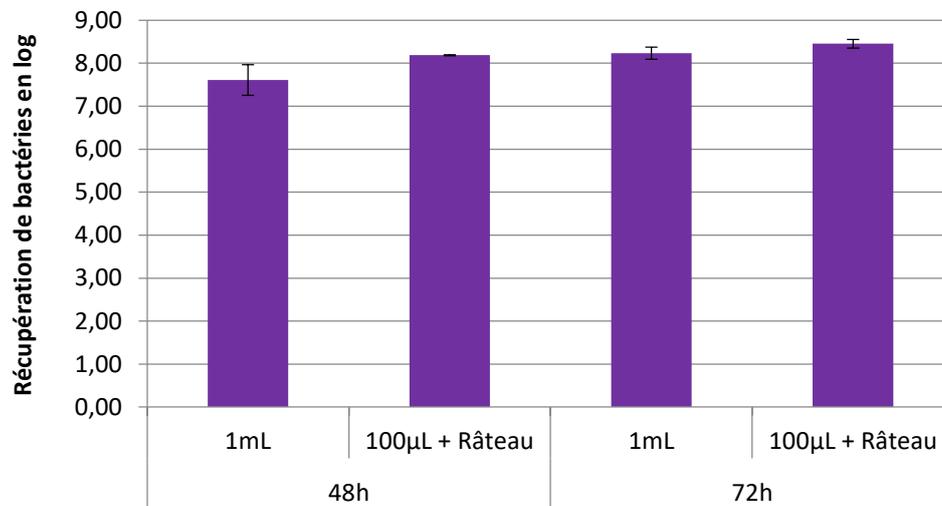


Figure 74. Comparaison de la récupération des bactéries de biofilm de PA14 sur support Lab-Tek flask®, en fonction du temps d'incubation et de deux types de dépôts des bactéries sur les géloses de LB agar dans les boîtes de Petri

Le dépôt de 1 mL de la dilution sur la gélose permet une récupération en bactéries de $7,61 \pm 0,36$ log à 48h et $8,23 \pm 0,14$ log à 72h. Les résultats du dépôt de 100 µL avec étalement montrent une récupération de $8,19 \pm 0,01$ log à 48h et $8,45 \pm 0,10$ log à 72h de temps d'incubation. Les résultats entre le dépôt de 1 mL et celui de 100 µL avec étalement sont significativement différents à 48h d'incubation (p -value = 0,033) mais pas à 72h (p -value = 0,082). La technique de dépôt de 100 µL de la dilution puis son étalement au râteau est privilégiée car elle permet une meilleure lisibilité des colonies sur les boîtes de Petri.

En conclusion de l'ensemble de ces essais, nous avons mis au point un protocole de formation des biofilms plus adapté à l'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses. Nous avons déterminé que les biofilms seront réalisés à l'aide de la souche bactérienne PA14 dans une Lab-Tek flask®. Le milieu TSB à $1/10^{\text{ème}}$ permettra leur développement pendant 48h ou 72h à une température de 25°C. Le détachement du biofilm est réalisé par agitation sur vortex avec des billes de verre et du TSB à $1/10^{\text{ème}}$ + Tween 80 à 0,1%. Enfin la technique de dépôt pour le comptage se fait sur une boîte de Petri gélosé de LB agar avec 100 µL de solution bactérienne qui sont ensuite étalés au râteau avant séchage.

3.2.1.6. Mise au point de la technique de coloration et d'utilisation du microscope confocal

En plus du comptage des bactéries présentes dans le biofilm, l'étude met l'accent sur l'utilisation de la microscopie pour l'observation des surfaces après traitement. L'observation des biofilms est réalisée par microscopie optique ainsi que par microscopie confocale. L'utilisation de la microscopie confocale nécessite un marquage des bactéries. Pour cela, nous avons utilisé un kit Live/Dead contenant deux fluorochromes, le Syto-9 et l'iodure de propidium. Le premier permet de marquer les bactéries vivantes en vert et l'iodure de propidium entraîne la coloration des bactéries mortes en rouge. Le principe du kit Live/Dead est que la fluorescence rouge de l'iodure de propidium, ne pénètre que dans les bactéries à membrane endommagée. Ce fluorochrome va ensuite prendre le dessus sur la fluorescence du Syto-9 qui lui pénètre à travers toutes les membranes des bactéries. Des essais de prise en main du marquage ont été nécessaires afin de paramétrer le microscope confocal et valider la bonne utilisation des fluorochromes.

Nous avons ainsi examiné le comportement des marqueurs en présence des biocides, le peroxyde d'hydrogène 12% et l'hypochlorite de sodium 5%. L'utilisation des fluorochromes avec l'hypochlorite de sodium à 5% met en évidence qu'aucune fluorescence n'est visible même après son retrait et le lavage de la surface. Il est possible qu'une interférence avec les deux fluorochromes et NaOCl existe, empêchant la coloration des bactéries. Ces mêmes essais de coloration réalisés avec des bactéries de Bt valident l'hypothèse d'une interférence entre les fluorochromes et l'hypochlorite de sodium. Les observations des bactéries et donc des biofilms traités par ce désinfectant ne sont pas réalisables avec notre protocole expérimental. Cette interférence entre les fluorochromes et NaOCl lors du marquage des biofilms n'est pas documentée mais des publications utilisant des concentrations en NaOCl bien inférieures à la nôtre ou à un pH neutre montrent un marquage par ce kit visible au microscope confocal (*Almatroudi, Gosbell et al., 2016, Wang, Cai et al., 2018*). Dans notre cas, une des hypothèses serait la présence en cristaux de chlore dans l'environnement des bactéries du biofilm et qui interagissent avec les fluorochromes. Une autre pourrait être l'élévation du pH à 12 du milieu dans lequel est le biofilm par NaOCl. Pour pouvoir utiliser l'imagerie confocale avec les biofilms traités par la mousse NaOCl, il serait intéressant de travailler sur le nettoyage des biofilms après traitement par ce biocide. Dans cette étude, nous n'avons pas utilisé l'imagerie en microscopie confocale pour l'ensemble des essais avec NaOCl.

Les bactéries en contact avec la mousse neutre et celle au peroxyde d'hydrogène sont bien marquées par les deux fluorochromes (le Syto-9 et l'iodure de propidium) et sont visibles en microscopie confocale. Ce marquage nous permet de distinguer clairement les bactéries mortes de celles des vivantes (Figure 75).

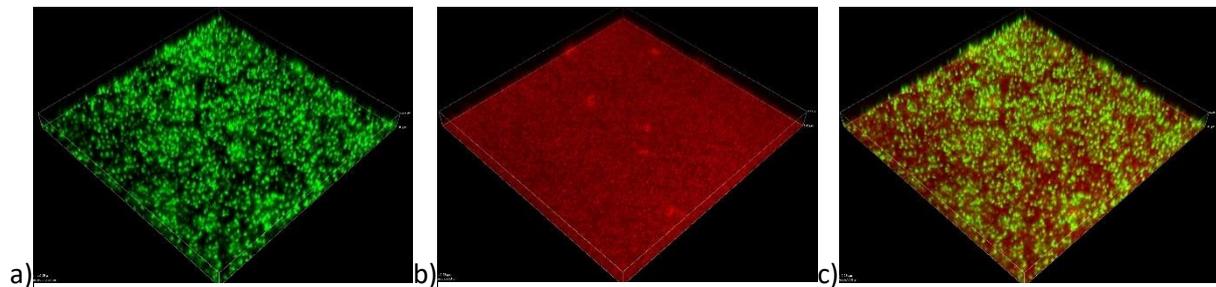


Figure 75. Bactéries d'un biofilm PA14 marquées au kit Live/Dead après traitement avec une mousse H_2O_2 ; images 3D acquises à partir de la microscopie confocale a) excitation à 488 nm ; b) excitation à 514 nm ; c) excitations à 514 et 488 nm

Le peroxyde d'hydrogène réagit avec les bactéries par oxydation, ce qui produit du dioxygène entraînant la formation de bulles (Figure 76) (Linley, Denyer *et al.*, 2012).

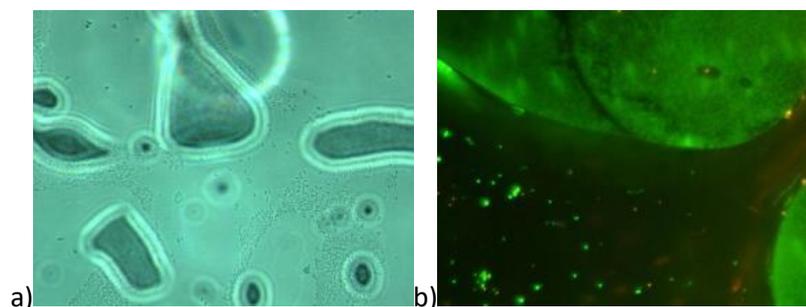


Figure 76. Bactéries de PA14 traitées par H_2O_2 et marquées par le kit Live/Dead ; a) image 2D acquise à partir de la microscopie optique et b) images 2D acquises à partir de la microscopie à fluorescence avec comme émission 460-500 nm

Ces bulles diminuent la visibilité des échantillons au microscope optique et fluorescent. Avec l'utilisation de nos mousses H_2O_2 contenant un tensioactif, ce phénomène de bullage peut être amplifié. Il est donc nécessaire de bien nettoyer la surface des biofilms traités après l'utilisation des mousses afin d'éviter la présence de bulles qui pourraient apparaître entre des résidus de peroxyde d'hydrogène et des bactéries encore présentes.

Enfin, la fluorescence naturelle des bactéries de PA14 a été étudiée pour s'assurer qu'elle n'interfère pas avec celle des fluorochromes. Cette fluorescence naturelle des

bactéries PA14 est effectivement faiblement visible en microscopie à fluorescence mais ne l'est pas en microscopie confocale à la longueur d'onde d'observation du Syto-9 (488 nm) (Figure 77).

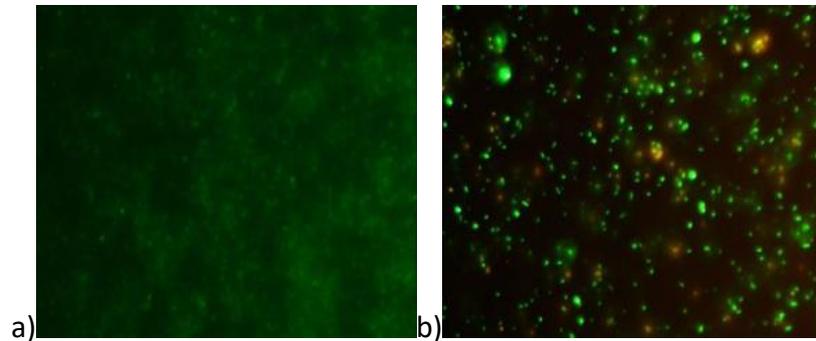


Figure 77. Bactéries de PA14 non marquées ; a) et b) images 2D acquise à partir de la microscopie à fluorescence (émission à 465-495 nm)

En conclusion, l'utilisation du kit Live/Dead en microscopie à fluorescence et confocale permet de distinguer les bactéries mortes des vivantes par fluorescence même après traitement des biofilms par la mousse neutre et H_2O_2 . Après traitement des biofilms avec la mousse $NaOCl$, la fluorescence émise par le Syto-9 et l'iodure de propidium n'est pas visible. Il existe donc une interférence entre l'hypochlorite de sodium à notre concentration et les fluorochromes, empêchant le marquage des bactéries en présence de ce désinfectant. De fait, l'imagerie en microscopie à fluorescence et confocale pour l'ensemble des essais est réalisée seulement pour les mousses neutres et H_2O_2 .

3.2.2. Efficacité des procédés de décontamination sur les biofilms bactériens

L'adaptation du protocole de formation et d'observation des biofilms a permis de prendre en main les techniques permettant d'évaluer l'efficacité de décontamination de nos mousses sur cette forme de résistance. A l'opposé de l'étude menée sur les spores, aucun essai n'a été réalisé avant la thèse entre les mousses et les biofilms. L'évaluation de l'efficacité de décontamination des biofilms par les mousses débute par des essais en position horizontale afin de déterminer une différence entre la solution liquide et la mousse, la quantité de bactéries transférées dans la mousse et l'influence du temps de contact. Suite à ces essais nous avons commencé une évaluation plus approfondie de l'efficacité de décontamination des mousses par l'utilisation de deux supports en position horizontale et en remplissage.

3.2.2.1. Différence d'efficacité entre le traitement par la solution liquide et celui par la mousse

Les premiers essais réalisés avec les désinfectants sur les biofilms permettent l'évaluation de la différence d'efficacité de décontamination entre l'utilisation des mousses et des solutions liquides. Les mousses et solutions liquides H₂O₂ et NaOCl sont mises en contact pendant 4 heures avec les biofilms dans des Lab-Teks flask®.

3.2.2.1.1. Evaluation de l'efficacité des mousses et solutions liquides contenant les désinfectants par comptage des bactéries encore viables après traitement

La décontamination des biofilms par la solution liquide et la mousse à NaOCl est supérieure à 8 log de bactéries ($8,39 \pm 0,31$ log de réduction) (Figure 78).

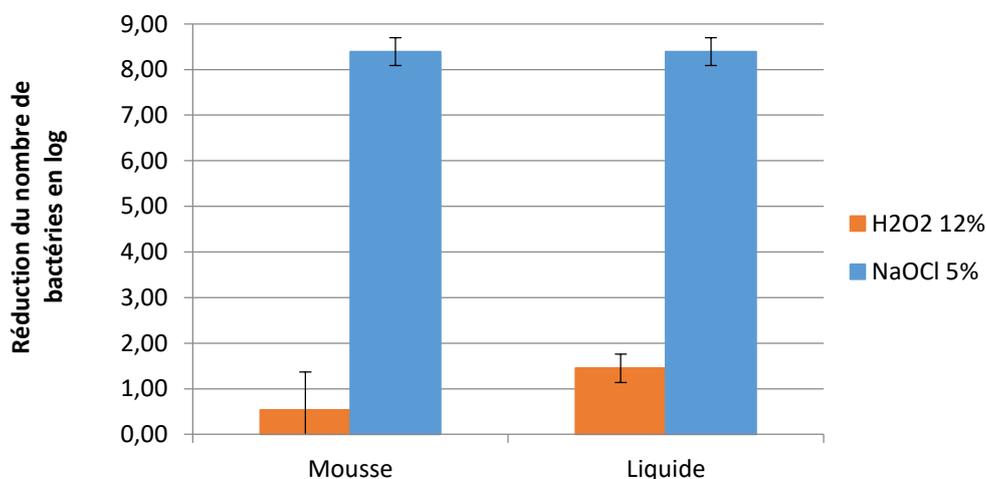


Figure 78. Réduction du nombre de bactéries PA14 en log après traitement du biofilm par les solutions liquides ou mousses H₂O₂ et NaOCl en 4 heures de temps de contact

Pour la solution liquide contenant H₂O₂ la réduction du nombre de bactéries du biofilm est de $1,45 \pm 0,31$ log et celle par la mousse est de $0,53 \pm 0,84$ log. Il n'y a pas de différence significative entre les résultats de décontamination par la mousse H₂O₂ et ceux pour la solution liquide (p-value = 0,716). Ces résultats montrent que la mousse NaOCl permet la décontamination totale d'un biofilm contenant au moins 10⁸ bactéries sur 9 cm² (équivalent à environ 10⁷/cm²). La mousse à H₂O₂ n'entraîne qu'une réduction de 1 log de bactéries sur ces mêmes biofilms. Des études ont démontré que les bactéries de *Pseudomonas aeruginosa* sont plus résistantes au peroxyde d'hydrogène qu'à l'hypochlorite de sodium (Sagripanti and Bonifacino, 2000). Cette différence d'efficacité est certainement due à la présence de catalase dans l'environnement des bactéries. La catalase contenue dans le biofilm réagit avec une partie du peroxyde d'hydrogène mis en contact. La quantité en peroxyde d'hydrogène n'est alors pas suffisante pour neutraliser plus de 1 log de bactéries, le désinfectant ayant en partie réagi avec la catalase. De plus, en termes d'efficacité de décontamination les mousses sont aussi efficaces que les solutions liquides. Ainsi, la mousse H₂O₂ permet la réduction d'un 1 log de bactéries du biofilm ce qui n'est pas suffisant pour s'assurer que celui-ci ne soit pas reformé à partir des bactéries encore viables. A contrario, l'utilisation d'une mousse NaOCl 5% permet en 4 heures la décontamination de la totalité du biofilm.

En conclusion, la solution liquide ainsi que la mousse NaOCl permettent la décontamination entière de biofilms de 9 cm² contenant plus de 10⁸ de bactéries, en 4 heures de contact. A l'opposé la mousse et la solution liquide H₂O₂ entraînent une décontamination minime des biofilms (environ 1 log) en 4 heures. Cette efficacité de décontamination moindre du peroxyde d'hydrogène est probablement due à la présence de catalase dans les biofilms. Ces résultats concordent avec ceux observés lors des essais sur les bactéries végétatives (Annexe 3). Le film de mouillage de la mousse NaOCl formé sur le biofilm horizontal permet un apport suffisant pour neutraliser l'ensemble des bactéries même si elles sont protégées par l'EPS. De plus, l'efficacité de décontamination de la mousse est la même que pour la solution liquide. Son utilisation permet donc de décontaminer aussi efficacement les bactéries qu'une solution liquide mais de produire moins d'effluents.

3.2.2.1.2. Observation des biofilms en microscopie après traitement

- Observation par microscopie des biofilms après un traitement par la solution liquide et la mousse NaOCl :

Les biofilms traités avec la mousse et la solution liquide NaOCl sont observés par microscopie optique. Là où un biofilm est très nettement visible après un traitement par une mousse ou une solution liquide neutre. Après l'application de NaOCl seuls quelques résidus sont observables. Il n'y a pas de différence visuelle entre les images après traitement par une solution liquide ou une mousse NaOCl (Figure 79 et Figure 80).

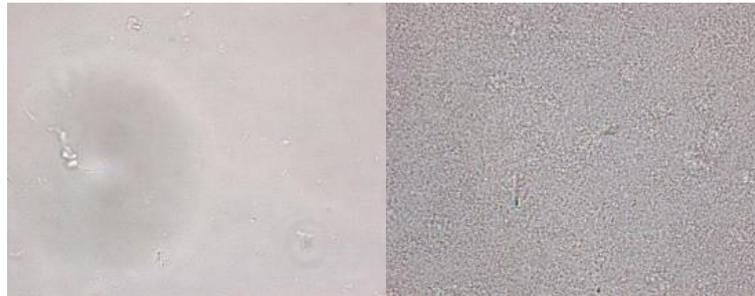


Figure 79. Biofilm de bactéries PA14 en image 2D acquise à partir de la microscopie optique :
a) après traitement avec la solution liquide NaOCl ; b) après traitement avec la solution liquide neutre (grossissement x 60)

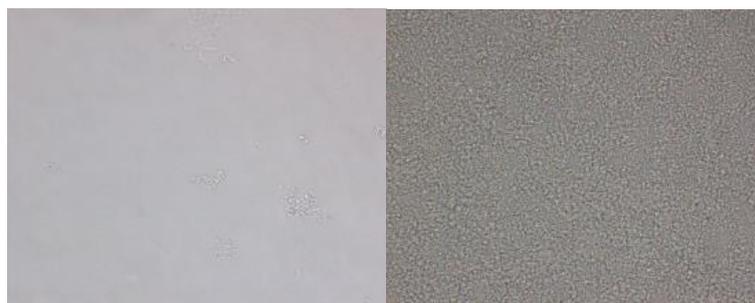


Figure 80. Biofilm de bactéries PA14 en image 2D acquise à partir de la microscopie optique :
a) après traitement avec la mousse NaOCl ; b) après traitement avec la mousse neutre (grossissement x 60)

En conclusion, la mousse NaOCl semble permettre la destruction du biofilm de son support. Il est donc possible que l'hypochlorite de sodium désagrège en partie la matrice d'exopolysaccharides permettant son accès aux bactéries et la perte d'adhésion du biofilm sur le support.

- Observation par microscopie des biofilms après un traitement par la solution liquide et la mousse H₂O₂ :

Les biofilms traités avec le désinfectant H₂O₂ ont été observés en microscopie confocale. Ceux traités par une solution liquide ou une mousse H₂O₂ semblent avoir une quantité de bactéries mortes équivalente à celle avec la solution ou la mousse neutre (Figure 81 et Figure 82).

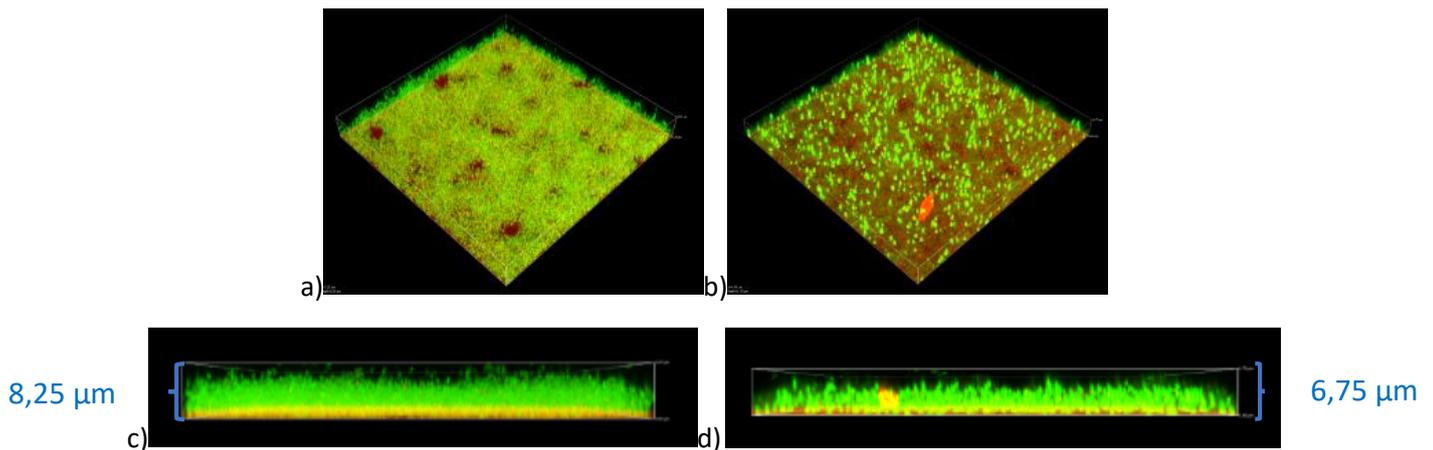


Figure 81. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c) après traitement par la solution liquide H₂O₂, images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement par la solution liquide neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale

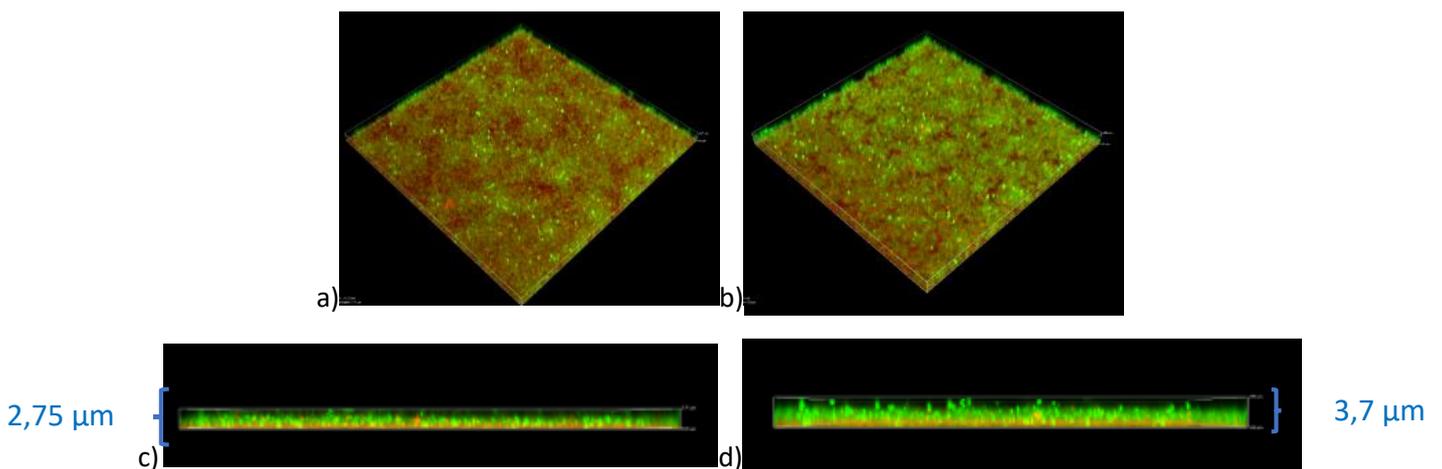


Figure 82. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c) après traitement par la mousse H₂O₂, images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement par la mousse neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale

L'épaisseur du biofilm est différente entre ceux traités avec une solution liquide (environ 7,5 μm) et ceux avec une mousse (environ 3,2 μm). En effet, les biofilms traités par les solutions liquides sont presque deux fois plus épais que ceux traités par les mousses. En comparant avec l'épaisseur des biofilms sans traitement (voir Figure 73 dans la partie 3.2.1.4.), nous observons que celle-ci est trois fois plus grande que celle des biofilms traités par les mousses. Il est possible que l'utilisation d'une mousse permette de détacher une partie du biofilm. Ce détachement peut être effectué par pénétration de la mousse entre les bactéries provoquant leur détachement. Une autre hypothèse serait la remontée capillaire des bactéries. Une grande partie de la mousse présente sur le biofilm draine pendant les 4 heures de temps de contact. Le liquide de drainage va s'insinuer dans le biofilm et ne plus être disponible pour réhydrater la mousse. Les films de mouillage devant être réhydratés, un effet de capillarité permettrait d'amorcer une force d'absorption des couches supérieures du biofilm afin d'amener du liquide dans la mousse devenue sèche. Cette action d'absorption capillaire aurait alors pour conséquence d'emporter les bactéries des couches supérieures du biofilm dans la mousse.

En conclusion, même sans la présence de biocide, la mousse a une activité sur l'épaisseur en bactéries du biofilm en la diminuant significativement. Cette réaction est même supérieure à celle d'une solution liquide. Il est donc possible que la mousse ait un effet propre comme sa pénétration entre les bactéries pour les détacher ou la remontée des bactéries des couches supérieures du biofilm par capillarité.

3.2.2.2. Transfert des bactéries du biofilm dans la mousse

Suite à ces premiers essais, nous avons cherché à savoir quelle est la quantité de bactéries transférées dans la mousse par rapport à celle qui reste adhérente sur le support. Pour cela, nous avons réalisé séparément les comptages en bactéries viables adhérentes aux supports de celles transférées dans les mousses.

Pour les essais avec la mousse NaOCl aucune bactérie n'est présente après le traitement que ce soit au niveau du support ou dans la mousse (Figure 83).

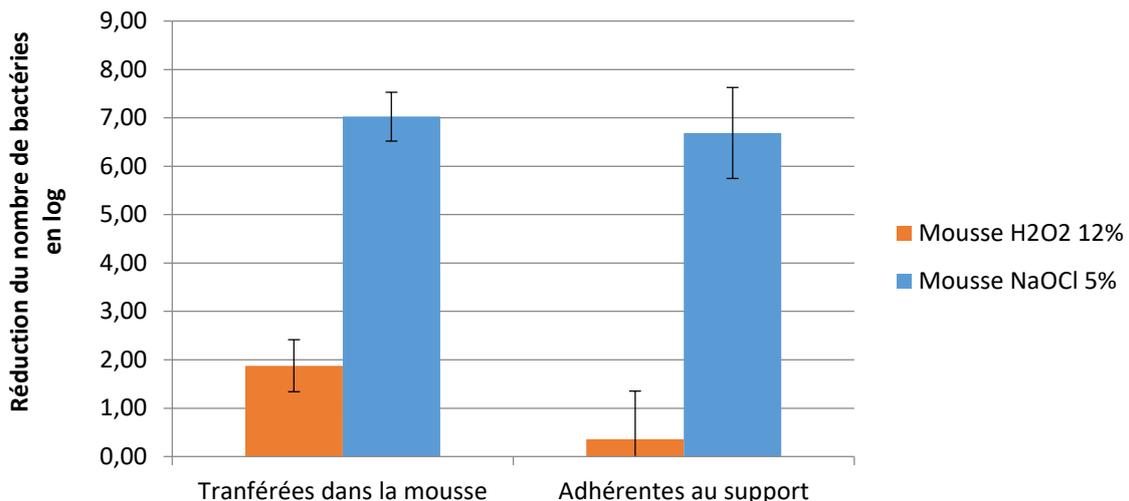


Figure 83. Réduction du nombre de bactéries PA14 en log transférées dans la mousse ou adhérentes au support, après traitement du biofilm par les mousses H₂O₂ et NaOCl en 4 heures de temps de contact

Les bactéries transférées dans la mousse NaOCl au cours des 4 heures de contact sont toutes inactivées. Ces bactéries sont probablement moins protégées par la matrice d'exopolysaccharides du biofilm et deviennent plus disponibles pour le désinfectant.

Pour la mousse H₂O₂ la décontamination des bactéries transférées dans la mousse est de $2,35 \pm 0,46$ log et sur le support de $1,15 \pm 0,49$ log. Cette différence est statistiquement significative (p -value = 0,038). Les résultats d'efficacité moindre peuvent être expliqués par la présence de catalase excrétée par les bactéries du biofilm. Le film de mouillage se forme sur le biofilm et rentre en contact avec la catalase qui réagit avec une partie du désinfectant. Le désinfectant restant dans le film du mouillage n'est pas suffisant pour permettre de décontaminer entièrement les bactéries transférées dans la mousse H₂O₂. Du coup, même après leur transfert au sein de la mousse, les bactéries ne sont pas toutes inactivées.

Enfin, des essais avec une mousse neutre permettent de s'assurer que la différence entre le nombre de bactéries transférées dans la mousse H₂O₂ de celles adhérentes sur le support n'est pas juste due à une différence de quantité mais bien à un effet du désinfectant (respectivement $7,5 \pm 0,43$ log de bactéries transférées et $7,47 \pm 0,38$ log bactéries adhérentes). Ces essais ont aussi permis de mettre en évidence un fort taux de transfert des bactéries dans la mousse. Ces résultats sont corrélés avec les images obtenues par la

microscopie confocale présentées en partie 3.2.2.1. En effet, après traitement par une mousse neutre ou H₂O₂ nous avons constaté que le biofilm a perdu la moitié de son épaisseur.

En conclusion, ces résultats ainsi que ceux obtenus par imagerie dans la partie précédente (3.2.2.1.2.) semblent démontrer un effet propre à la mousse sur les couches supérieures de bactéries du biofilm. La mousse sans biocide permettrait le transfert d'une partie des bactéries équivalente à la moitié de l'épaisseur au sein de la mousse. Cette quantité de bactéries transférées dans la mousse est supérieure à celle dans la solution liquide. Les bactéries transférées dans la mousse ou solution liquide NaOCl sont toutes décontaminées en 4 heures de contact. Celles transférées dans la solution liquide et la mousse H₂O₂ ne sont pas entièrement éliminées. Il est possible que la catalase excrétée par les bactéries dans le biofilm réagisse avec le désinfectant H₂O₂ au niveau du film de mouillage. La quantité de peroxyde d'hydrogène neutralisée est trop importante pour permettre la décontamination de 7 logs de bactéries dans la mousse (2 logs).

3.2.2.3. Evaluation du temps de contact entre la mousse et le biofilm

Afin de compléter cette étude préliminaire sur l'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms, nous avons testé différents temps de contact entre la mousse et le biofilm. Cette évaluation a été réalisée en 1 heure, 2 heures et 4 heures de contact entre l'ensemble des mousses avec les biofilms.

3.2.2.3.1. Evaluation de l'efficacité de décontamination des mousses par comptage des bactéries viables après traitement

Pour la mousse NaOCl la décontamination est totale dès 1 heure de temps de contact avec le biofilm (réduction d'au moins $8,58 \pm 0,30$ log de bactéries). Pour la mousse H₂O₂, les résultats après 1 heure et 2 heures de temps de contact sont équivalents à ceux pour 4 heures (réduction de $1,30 \pm 0,30$ log à 1 heure et $1,31 \pm 0,30$ log de bactéries après 2 heures).

En conclusion, la mousse NaOCl permet la décontamination d'un biofilm de 9 cm² contenant plus de 10⁸ bactéries en 1 heure de contact en position horizontale.

3.2.2.3.2. Observation des biofilms en microscopie après traitement par une mousse H₂O₂ et neutre

Les biofilms traités par les mousses H₂O₂ et neutres ont été analysés en microscopie confocale après 1 heure et 4 heures de temps de contact. L'épaisseur des biofilms mesurée

après une heure de temps de contact est d'environ 5,5 μm pour les essais avec la mousse neutre mais aussi avec celle à H_2O_2 (Figure 84 c et d).

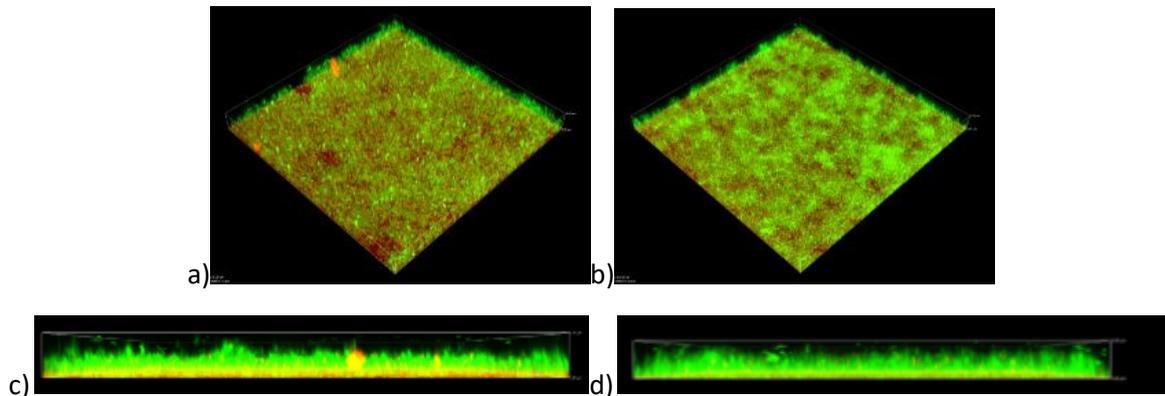


Figure 84. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c) après traitement de 1h par la mousse H_2O_2 , images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement de 1h par la mousse neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale

Comme présenté en partie 3.2.2.1, l'épaisseur des biofilms est d'environ 3,7 μm après traitement par la mousse neutre et 2,75 μm pour la mousse H_2O_2 (Figure 85 c et d).

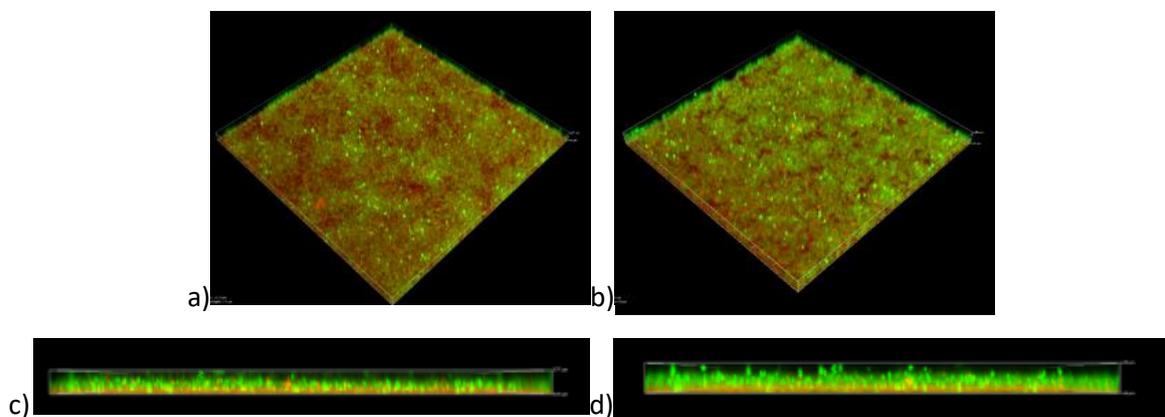


Figure 85. Biofilms de bactéries PA14 marquées au kit Live/Dead ; a et c) après traitement de 4h par la mousse H_2O_2 , images 3D (a) et axe X (c) acquises à partir de la microscopie confocale ; b et d) après traitement de 4h par la mousse neutre, images 3D (b) et axe X (d) acquises à partir de la microscopie confocale

De plus, la diminution de la quantité de bactéries marquées par le Syto-9 sur les couches extérieures du biofilm entre les essais à 1 heure et 4 heures de temps de contact est nettement visible (Figure 84 a et b et Figure 85 a et b). Ces résultats iraient dans le sens de

l'hypothèse sur l'amorçage de la remontée capillaire des couches supérieures du biofilm lorsque la mousse devient sèche. Après 1 heure de temps de contact, la mousse n'est pas suffisamment sèche pour avoir besoin de se réhydrater par capillarité et donc l'épaisseur du biofilm est presque identique à celle d'un traitement par une solution liquide. Après 4 heures par contre, la mousse sèche cherche à se réhydrater et donc entraîne le transfert des bactéries des couches supérieures du biofilm par capillarité.

En conclusion, l'effet propre à la mousse qui permet de supprimer les couches supérieures de bactéries du biofilm se ferait après un certain temps de contact entre la mousse et la contamination (> à 1 heure). Ces résultats semblent privilégier l'hypothèse d'une remontée des bactéries par capillarité quand la mousse devient plus sèche au cours du temps.

3.2.2.4. Efficacité de décontamination de la mousse NaOCl sur différents matériaux en position horizontale et en remplissage

L'ensemble des essais précédent sur l'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms a permis de démontrer que seule la mousse NaOCl 5% est efficace sur les biofilms en seulement 1 heure de temps de contact. Nous avons donc poursuivi les essais d'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms seulement avec le désinfectant NaOCl. La mousse NaOCl a été testée avec des biofilms formés sur différents matériaux et suivant différentes positions. Ainsi, la mousse NaOCl a été appliquée sur des supports en polystyrène et en acier inoxydable soit en position horizontale soit par remplissage.

Les résultats montrent que la mousse NaOCl permet une décontamination supérieure à 7 log sur le polystyrène quelle que soit sa position (réduction de $8,02 \pm 0,43$ log à l'horizontal et $7,31 \pm 0,00$ log en remplissage). De même, sur l'acier inoxydable la décontamination des supports par la mousse NaOCl est totale pour l'ensemble des configurations du support ($7,40 \pm 0,00$ log à l'horizontal et $7,11 \pm 0,00$ log en remplissage) (Figure 86).

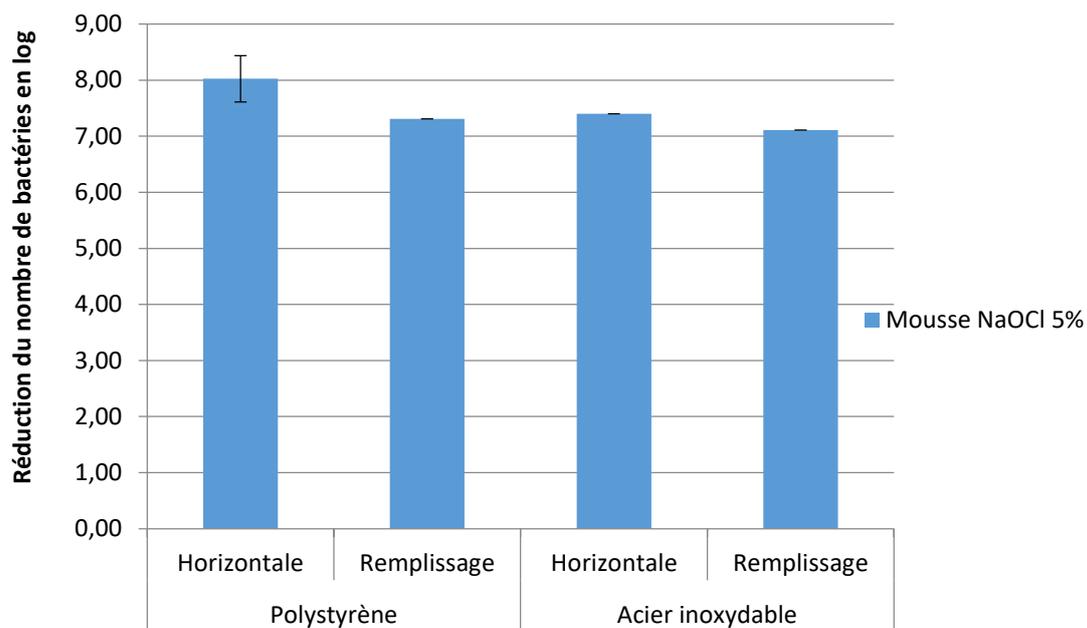


Figure 86. Efficacité de décontamination de la mousse NaOCl 5% sur différents supports contaminés par des biofilms de PA14 après une heure d'action en position horizontale ou en remplissage

En conclusion, ces essais ont permis de démontrer que la mousse NaOCl à 5% entraîne la décontamination totale des biofilms (> 7 logs de bactéries sur 17 cm²) sur du polystyrène et de l'acier inoxydable et à la fois en position horizontale et en remplissage, en moins d'une heure de temps de contact.

3.2.3. Conclusion de l'étude d'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms bactériens

Cette étude exploratoire menée sur les biofilms a permis les premières évaluations d'efficacité de décontamination des mousses sur ces formes de résistance. Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole de formation des biofilms permettant l'utilisation des mousses. Ce protocole doit être facilement réalisable et permettre l'application des mousses et leur récupération, leur observation au microscope confocal, ainsi que le comptage des bactéries restées adhérentes sur le support. La mise en place de ce protocole adapté aux mousses a été réalisée par l'évaluation de la récupération lors d'essais de différentes techniques de lavage, de détachement du biofilm et de dépôt des bactéries. De même, des essais ont porté sur l'optimisation de la température, le milieu et le matériel de formation du biofilm. Le protocole dégagé de ces essais permet la formation d'un biofilm d'environ 10 μm contenant plus de 10^7 bactéries sur 9 cm^2 ($> 10^6$ bactéries/ cm^2), facilement manipulable et pouvant être traité par une mousse. De même, il est adapté à d'autres supports comme en témoigne les essais sur les lames en polystyrène et en acier inoxydable.

En plus de l'utilisation des comptages pour l'étude de l'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms, nous avons souhaité compléter les résultats avec de l'imagerie en microscopie confocale. Nous avons alors testé la compatibilité des composés de la mousse avec les fluorochromes du kit de coloration Live/Dead. Les fluorochromes composant ce kit (Syto-9 et iodure de propidium) permettent de distinguer les bactéries mortes des vivantes par fluorescence après le traitement des biofilms par la mousse neutre et H_2O_2 . Après traitement des biofilms avec la mousse NaOCl 5%, la fluorescence émise par le Syto-9 et l'iodure de propidium n'est pas visible. Il existe donc une interférence entre l'hypochlorite de sodium et les fluorochromes empêchant le marquage des bactéries suivant le protocole utilisé pour cette étude. La microscopie confocale comme contrôle des résultats des comptages de bactéries après traitement des biofilms par les mousses est utilisée pour les mousses neutres et H_2O_2 .

L'efficacité de décontamination des biofilms par les mousses a été évaluée pour les deux biocides. Pour NaOCl , la solution liquide ainsi que la mousse permettent la décontamination entière de biofilms de plus de 10^7 de bactéries sur 9 cm^2 ($> 10^6$ bactéries/ cm^2) en 1 heure de contact. Grâce à la microscopie optique, nous avons constaté

que les biofilms sont entièrement détachés du support. De plus, les bactéries transférées dans la mousse sont entièrement inactivées. L'hypochlorite de sodium agit donc sur le biofilm entraînant une perte d'adhésion du biofilm sur le support et l'inactivation des bactéries transférées au sein de la mousse. De plus, il est possible que NaOCl désagrège tout ou partie la matrice d'exopolysaccharides permettant son accès aux bactéries. Enfin, des premiers essais ont permis de mettre en évidence la décontamination totale de biofilms formés sur du polystyrène et de l'acier inoxydable, traités en position horizontale et en remplissage par la mousse NaOCl à 5% en une heure de temps de contact.

A l'opposé la mousse et la solution liquide H₂O₂ entraînent une décontamination minimale des biofilms (environ 1 log) en 4 heures. Cette efficacité moindre du peroxyde d'hydrogène est probablement due à la présence de catalase dans le biofilm, les bactéries de *Pseudomonas aeruginosa* étant catalase positive. Ces résultats concordent avec ceux observés lors des essais sur les bactéries végétatives (Annexe 3). Celles transférées dans la solution liquide et la mousse H₂O₂ ne sont pas entièrement décontaminées. De fait, la catalase excrétée par les bactéries dans le biofilm, réagit avec le désinfectant H₂O₂ au niveau du film de mouillage. La quantité de peroxyde d'hydrogène neutralisée est trop importante pour permettre la décontamination de 7 logs de bactéries dans la mousse (2 logs).

Le film de mouillage de la mousse NaOCl se forme correctement sur le biofilm en position horizontale ainsi qu'en position verticale lors des essais de remplissage. Il permet un apport en désinfectant suffisant au contact des bactéries pour les décontaminer et détacher le biofilm. Cette diffusion du biofilm et le détachement des biofilms par ces mousses indiqueraient que l'hypochlorite de sodium détruit l'exopolysaccharide qui permettait l'ancrage du biofilm sur le support.

Un autre phénomène propre à la mousse a pu être mis en évidence. Même sans la présence de biocide, la mousse impacte l'épaisseur du biofilm en la diminuant significativement. La mousse permettrait le transfert d'une partie des bactéries des couches supérieures du biofilm, équivalente à la moitié de l'épaisseur au sein de la mousse. Cette quantité de bactéries transférées dans la mousse est supérieure à celle dans la solution liquide. Il est donc possible que la mousse provoque une remontée des bactéries des couches supérieures du biofilm par capillarité. Cette hypothèse semble appuyée par la suppression des couches supérieures de bactéries du biofilm qui se ferait après un certain temps de contact

donc après que la mousse ait en partie drainé. Enfin, la mousse déposée sur le biofilm a un rôle de barrière. Cette barrière physique permet de limiter l'essaimage des bactéries du biofilm cherchant à coloniser de nouveaux espaces.

Ces premiers essais indiquent que l'utilisation de la mousse NaOCl permet la décontamination de biofilms de 10^6 bactéries/cm² en une heure maximum. Il est maintenant nécessaire de réaliser sur les biofilms la même étude que celle réalisée sur les spores. Ces essais permettraient d'évaluer l'efficacité de décontamination des mousses sur différents matériaux, en présence de substances interférentes, sur une surface verticale, en remplissage et à différentes températures. Elle permettrait aussi de qualifier le procédé sur les biofilms en vue de l'utilisation de la mousse dans les milieux hospitaliers et agroalimentaires.

Conclusions et perspectives

4. Conclusions et perspectives

L'objectif principal de la thèse est d'approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action de mousses de décontamination biocides sur deux formes de résistance bactérienne, les spores et les biofilms. Les mousses biocides étudiées ont une fraction liquide de 5,5%, permettant de réduire 18 fois la quantité d'effluents après traitement par rapport à l'utilisation d'une solution liquide. De plus, elle forme une barrière physique empêchant la dissémination de la contamination. Ces mousses contiennent du Xanthane à 3 g/L et un biocide, soit de l'hypochlorite de sodium à 5% ou du peroxyde d'hydrogène à 12%. Chacun de ces biocides a un mode d'action qui lui est propre sur les spores et sur les biofilms. Leurs mécanismes d'action sous forme de mousses biocides ont été étudiés suivant leurs futures mises en œuvre sur le terrain lors de contaminations accidentelles ou intentionnelles : pulvérisation au sol ; talochage et pulvérisation sur les murs ; remplissage de pièces entières (murs et sols). De même, l'influence de facteurs environnementaux a été évaluée afin de répondre aux besoins rencontrés notamment dans les domaines de la biodéfense, hospitaliers et agroalimentaires.

➤ Mode d'action propre des biocides sur les spores et les biofilms :

Les modes d'inactivation des spores par les désinfectants NaOCl et H₂O₂ sont connus dans la littérature. Ces biocides traversent les multicouches de la spore jusqu'à la membrane interne. L'hypochlorite de sodium détruit les récepteurs à nutriments et ceux nécessaires à la lyse du cortex durant la germination. L'endommagement des récepteurs par NaOCl, ainsi que les dégâts sévères sur la membrane interne empêchent la germination des spores. Quant au peroxyde d'hydrogène, il cible les enzymes métaboliques nécessaires à la germination présentes dans le core.

Sur les biofilms, nous avons constaté dans cette étude des mécanismes d'action très différents entre ces deux désinfectants. Des observations par microscopie optique montrent que l'hypochlorite de sodium détruit l'ensemble du biofilm, laissant après traitement des résidus cellulaires. Une hypothèse sur l'action de l'hypochlorite de sodium sur les biofilms est sa capacité à dissoudre l'exopolysaccharide protégeant les bactéries. Ainsi, sans cette matrice protectrice, les bactéries deviennent accessibles pour le biocide qui les inactive et le biofilm finit par se détacher de la surface du support. Pour le peroxyde d'hydrogène, l'étude a montré

une efficacité moindre de ce désinfectant sur les biofilms qui est certainement due à la sécrétion de catalase par les bactéries. Les bactéries de *P. aeruginosa* étant catalase positive, elles sécrètent dans leur environnement cette enzyme qui réagit avec le biocide et l'inactive en partie au niveau du film de mouillage.

➤ Mode d'action des mousses biocides sur une surface horizontale contaminée :

L'efficacité de décontamination des biocides sur spores et biofilms sous forme de mousses dépend de la capacité de la mousse à constituer le film de mouillage sur la contamination. En position horizontale, cette formation est favorisée.

Le désinfectant contenu dans le film de mouillage est consommé en réagissant avec la contamination. Le film de mouillage formé sur la surface horizontale par la mousse NaOCl à 5% est suffisamment recouvrant et la réaction immédiate pour assurer la décontamination de 7 logs de spores en 30 minutes et des biofilms de 10^7 bactéries/cm² en une heure. A l'opposé, la concentration en H₂O₂ et/ou son temps de contact avec la contamination, ne permettent ni l'inactivation de l'ensemble des spores en 30 minutes ni celle des biofilms à 10^7 bactéries/cm² en 4 heures. Dans ces conditions actuelles d'utilisation, la quantité en H₂O₂ dans le film de mouillage n'est pas suffisante pour assurer la décontamination des spores et biofilms que ce soit avant ou après le drainage du liquide sur la contamination. Cette différence d'efficacité de décontamination entre les deux biocides provient certainement des propriétés intrinsèques des désinfectants.

Dans le cas des biofilms, un phénomène autre que l'action du biocide et propre à la mousse a pu être étudié lors des essais de décontamination de biofilms. En effet, la mousse neutre sans biocide semble diminuer l'épaisseur du biofilm et permettrait le transfert de la moitié de l'épaisseur d'un biofilm de 10 µm en 4 heures. La suppression des couches supérieures de bactéries du biofilm est observable après un certain temps de contact (après 1 heure minimum) donc après que la mousse ait en partie drainé. L'hypothèse privilégiée est la remontée des bactéries par capillarité dans la mousse. Une grande partie de la mousse présente sur le biofilm ayant drainé, le liquide de drainage va s'insinuer dans le biofilm. Un effet d'absorption capillaire entraînant les bactéries dans la mousse serait amorcé sur le dessus du biofilm afin d'amener du liquide dans la mousse devenue sèche.

➤ Mode d'action des mousses sur une surface verticale contaminée :

Nous avons mis en évidence au cours de la thèse que le comportement des mousses suite à leur talochage sur une surface en position verticale est dépendant de leur composition. Avec Xanthane, le film de mouillage vertical est suffisamment stable et recouvrant pour permettre un apport suffisant en désinfectant pour décontaminer 7 logs de spores en 30 minutes pour la mousse NaOCl 5% et en un temps de contact supérieur à 30 minutes pour la mousse H₂O₂. Or, les mousses glissent sous leur propre poids le long de la paroi verticale après leur talochage. L'épaisseur du film de mouillage formé sur la paroi verticale lors de cette mise en œuvre est différente de celle observable lors d'une utilisation en position horizontale. Lors du glissement de la mousse au-dessus de la contamination, le film de mouillage contenant le biocide ruisselle davantage le long de la paroi permettant le renouvellement du désinfectant au fur et à mesure de sa consommation. Un détachement de la contamination est favorisé par le glissement du film de mouillage. Les spores peuvent ainsi être entraînées et y être piégées, facilitant ainsi leur décontamination. Une fois la mousse entièrement glissée, il reste un film de mouillage dont l'épaisseur diminue en séchant et la réaction du biocide s'arrête.

Les mousses ne contenant pas de Xanthane ont une fraction liquide plus basse (3,5%) que celles en contenant. Elles ne sont pas emportées par leur poids mais restent adhérentes à la surface et finissent par s'évaporer. La décontamination des spores sur le support vertical par les deux mousses est de plus de 7 logs en 30 minutes même après leur évaporation. Avant évaporation, le film de mouillage contenant le désinfectant est constitué et peut ruisseler le long de la paroi. Au cours de l'évaporation, l'épaisseur de la couche de mousse diminue et finit par sécher jusqu'à disparition de la mousse. Le film est alors à l'air libre et s'amincit par séchage jusqu'à disparition. Il est possible que son épaisseur reste suffisante pour apporter suffisamment de désinfectant pour assurer la décontamination en 30 minutes. De plus, le désinfectant peut se concentrer lors de l'évaporation du film de mouillage et permettre la prolongation de l'activité de décontamination sur les spores de quelques minutes après disparition du film de mouillage.

➤ Mode d'action des mousses suite au remplissage d'une infrastructure :

Dans cette partie, nous avons étudié une troisième voie de mise en œuvre de la mousse, le remplissage. Le film de mouillage en remplissage est suffisamment recouvrant et

stable pour permettre la décontamination de 7 logs de spores en 30 minutes pour la mousse à NaOCl 5% et 45 minutes pour celle H₂O₂ 12%. De plus, le film de mouillage se forme correctement sur les biofilms présents sur des supports de polystyrène et d'acier inoxydable et permet leur décontamination (environ 10⁶ bactéries/cm²) par remplissage en 1 heure de contact. En présence d'un support contaminé placé à la verticale dans la mousse, le désinfectant dans le film de mouillage du support est renouvelé par la diffusion du cœur de la mousse vers le film de mouillage. Le film de mouillage est stabilisé avec un agent stabilisant comme le Xanthane qui ralentit son ruissellement. L'ajout d'agent stabilisant (3 g/L de Xanthane) dans la formulation des mousses permet de retarder le drainage d'environ 1 heure pour la mousse NaOCl et de 2 heures pour celle H₂O₂. Les mousses générées à partir de solutions commerciales n'ont pas ou peu d'agent stabilisant dans leur formulation, ni une fraction liquide contrôlée. Elles ne sont pas appropriées à une utilisation en remplissage car leur drainage est trop rapide et leur fraction liquide est trop importante. Dans notre étude, même si les mousses sans Xanthane ont une efficacité de décontamination finale identique aux mousses avec Xanthane, sur de grands volumes leur utilisation ne permettra pas d'assurer un bon remplissage. La présence de Xanthane et la faible fraction liquide de nos mousses sont les véritables atouts pour leur utilisation en remplissage d'infrastructures de grands volumes. De plus, les mousses contenant du Xanthane ont la capacité de drainer entièrement après un certain temps.

Enfin, l'utilisation de la mousse en remplissage peut permettre la décontamination volumique de contaminants encore en suspension dans l'air après aérosolisation ou dans les gaines de ventilation. Une mousse NaOCl à 5% permet la décontamination de 7 logs de spores libres en 30 minutes en présence de Xanthane à 3 g/L. La concentration en H₂O₂ dans la mousse n'est pas suffisante pour permettre la décontamination de plus de 2 logs en 30 minutes (limitation par la catalase). Les spores entrent vraisemblablement en contact avec le biocide au niveau des films liquides. L'agent stabilisant augmentant la viscosité de la mousse améliore l'efficacité de décontamination des mousses NaOCl sur les spores en suspension dans l'air. Les spores sont plus longtemps piégées dans la mousse contenant le Xanthane rendant plus facile leur accès aux désinfectants.

➤ Recommandations d'usages des mousses suivant différents facteurs environnementaux :

Dans cette étude, différents facteurs pouvant influencer l'efficacité de décontamination ont été testés : la variété des souches bactériennes, la présence de substances interférentes, la composition des matériaux, la température. L'ensemble des essais effectués a permis de dégager des recommandations d'emploi pour les futurs utilisateurs des mousses biocides :

- L'utilisation de la mousse NaOCl à 5% doit être privilégiée en présence de spores thermorésistantes comme celles de *Geobacillus stearothermophilus* et de bactéries productrices de catalase. En effet, le peroxyde d'hydrogène contenu dans le film de mouillage est inactivé en réagissant avec la catalase. La concentration en désinfectant devient alors trop faible pour permettre la décontamination des supports. Pour pallier à cette limitation, il est recommandé d'augmenter la concentration en peroxyde d'hydrogène, afin de conserver une quantité de désinfectant permettant l'inactivation des spores même après réaction avec la catalase.

- En présence de substances interférentes comme de la matière organique, de la terre et de l'huile, nous recommandons un premier nettoyage de la surface avec un détergent (lingettes/spray) avant sa décontamination par la mousse. En cas de matière organique (sang) le nettoyage permet d'enlever les protéines inactivant l'hypochlorite de sodium qui serait en quantité insuffisante pour permettre la décontamination de l'ensemble du support. En cas de terre ou d'huile, un premier nettoyage avec un détergent permettra l'accès à la contamination par les biocides contenus dans la mousse appliquée ensuite.

- Sur des matériaux poreux comme le mortier, un seul traitement mousse ne suffit pas pour décontaminer l'ensemble des spores. Un premier traitement avec les mousses sur le mortier permet la décontamination d'environ 4 logs de spores Bt en 30 minutes. Il est donc préconisé de réaliser un second traitement avec des mousses fraîches sur ces matériaux poreux comme le mortier, la moquette, les tapis, le bois et le ciment qui sont connus pour être plus difficile à décontaminer.

- Le temps de contact recommandé entre la mousse H₂O₂ et une contamination (hors bactéries catalases positives) doit être de minimum une heure sur des matériaux comme le verre ou l'acier inoxydable en position verticale et sur des parois verticales. Ce temps de

contact peut être aussi estimé en fonction de la température ambiante, la cinétique de réaction de décontamination de la mousse H₂O₂ suivant la loi d'Arrhenius.

- Enfin, lors d'une utilisation en extérieur la température ambiante doit être prise en compte. Comme nous l'avons vu dans cette étude des températures trop basses (4°C) ralentissent fortement les réactions du désinfectant sur la contamination. A cette température, il est donc nécessaire d'augmenter le temps de contact de la mousse ou de faire un second traitement. Le temps de contact, peut atteindre plusieurs heures (3 heures pour la mousse H₂O₂ et 1h40 pour la mousse NaOCl), grâce à la présence du Xanthane dans la mousse.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de dégager l'intérêt de la mousse NaOCl 5% par rapport à celle H₂O₂ 12% pour la décontamination d'infrastructures contaminées par des agents biologiques. La mousse NaOCl à 5,5 % en fraction liquide répond aux attentes et aux besoins pour une utilisation en décontamination d'agents de la menace biologique (réduction de 7 logs de spores en 1 heure). Cette mousse est suffisamment mature pour pouvoir faire l'objet d'un futur transfert industriel. Cependant, pour pouvoir accéder aux marchés dans les domaines hospitaliers et agroalimentaires, il est nécessaire d'effectuer des études complémentaires particulièrement sur les biofilms. En effet, les modes d'action des mousses doivent être encore précisés sur les biofilms de la même manière qu'ils l'ont été sur les spores. Ainsi, une campagne d'expérimentations afin de quantifier l'efficacité de décontamination des mousses sur les biofilms doit être réalisée sur différents matériaux, en présence de substances interférentes, à différentes températures et suivant différentes mises en œuvre (horizontale, verticale et remplissage).

Annexes

Annexe 1

New biocide foam containing hydrogen peroxide for the decontamination of vertical surface contaminated with *Bacillus thuringiensis* spores

Esther Le Toquin^{1,3}, Sylvain Faure², Nicole Orange³, Fabienne Gas^{1*}

¹ Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), DRF, CEA, INRA, Bagnols-sur-Cèze, France

² Laboratoire des Procédés Supercritiques et Décontamination (LPSD), Service d'études des technologies pour l'assainissement démantèlement et l'étanchéité (SEAD), DE2D, Univ. Montpellier, DEN, CEA, Bagnols-sur-Cèze, France

³ Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM), Université de Rouen, Evreux, France

*** Correspondence:**
Fabienne Gas
fabienne.gas@cea.fr

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, spores, decontamination, hydrogen peroxide, foam, biocide. (Min.5-Max. 8)

Abstract

Despite scientific advances, bacterial spores remain a major preoccupation in many different fields, such as the hospital, food and CBRN-E Defense sector. Although many disinfectant technologies exist, there is a lack for the decontamination of difficult to access areas, outdoor sites or large interior volumes. This study evaluates the decontamination efficiency of an aqueous foam containing hydrogen peroxide, with the efficiency of disinfectant in the liquid form on vertical surfaces contaminated by *Bacillus thurengiensis* spores. The decontamination efficiency impact of the surfactant and stabilizer agents in the foam and liquid forms was evaluated. No interferences were observed with these two chemical additives. Our results indicate that the decontamination kinetics of both foam and liquid forms are similar. In addition, while the foam form was as efficient as the liquid solution at 4°C, it was even more so at 30°C. The foam decontamination reaction follows the Arrhenius law, which enables the decontamination kinetic to be predicted with the temperature. Moreover, the foam process used via spraying or filling is more attractive due to the generation of lower quantity of liquid effluents. Our findings highlight the greater suitability of foam to decontaminate difficult to access and high volume facilities compared to liquid solutions.

Introduction

Certain Gram-positive bacteria, like *Bacillus* and *Clostridium* species, are able to protect themselves from environmental stress or nutrient depletion by a sporulation process. Vegetative cells that pass into a dormant spore state are known to be much more resistant to the environment and to disinfection treatments than growing cells of the same species (Nicholson et al., 2000; Driks, 2002b; Piggot and Hilbert, 2004; Higgins and Dworkin, 2012; Wood et al., 2015). Several factors have been identified as responsible for the increased spore resistance. A thick spore coat protects the inner layers from lytic enzymes and from many chemicals, including chlorine dioxide and sodium hypochlorite (Driks, 1999; 2002a). The extremely low spore permeability enables the protection of the inner spore membrane against hydrophilic agents and possible UV and γ -radiation (Riesenman and Nicholson, 2000; Doona, 2015). The reduced water content in the core protects the spore from dry and wet heat, enabling it to survive for longer periods of time in a hostile environment (Setlow, 2006; Leggett et al., 2012). The spore DNA is saturated with small acid-soluble proteins (SAPS) of the α/β type and the high presence of calcium-dipicolinic acid chelate inside the spore core makes spore destruction more difficult by UV radiation, heat and some genotoxic chemicals (Setlow et al., 2006; Moeller et al., 2009). Finally, the DNA repair mechanisms occur just at the beginning of germination when the spore returns to growth-cell life (Setlow, 1992). Bacterial spores have always been considered as a threat either through their potential for use as biological weapons (e.g. the 2001 anthrax attack in the USA) (Schmitt and Zacchia, 2012), or because of food and hospital contaminations (Faille et al., 2014; Yi et al., 2016; Fernandes et al., 2017).

Several decontamination technologies have been proposed in the past and different sporicidal treatments are known. UV radiation and genotoxic chemicals damage spore DNA (Tennen et al., 2000); strong acid disrupts spore integrity; peroxydinitrite and other chemicals damage the spore inner membrane (Genest et al., 2002), and heat or peroxides disrupt the spore germination apparatus by targeting key proteins (Loshon et al., 2001; Melly et al., 2002). The choice of a decontamination treatment depends on the way to use the technology, the biocide efficiency of the treatment, the type of contaminated surfaces, the energy quantity and basic materials needed for the decontamination, and the quantity of waste products after treatment (Sagripanti and Bonifacino, 1999; Wood et al., 2011; Ryan et al., 2014; van Bokhorst-van de Veen et al., 2015). Each treatment presents different advantages: different means of implementation for a method applying chemical products (wet wipes, sprays or fumigation) (Otter and French, 2009, Kenters et al., 2017), no waste after treatment with UV radiation, good dispersion of biocide products by fumigation for closed areas. But few processes are able to efficiently decontaminate, without extra costs or high quantities of waste, outdoor and indoor sites with large volumes or hard to access areas like ventilation pipes (Schmitt and Zacchia, 2012; Edmonds et al., 2014).

To date several laboratories offer commercial foaming solutions and sprayers to decontaminate surfaces. These disinfecting formulations contain foaming surfactants and an active substance, sodium hypochlorite or hydrogen peroxide, but not a stabilizing agent (Environmental Protection Agency, 2006). A stabilizing agent enables the foam to be stabilized in time, thus decreasing the foam drainage and increasing the contact time with the contamination (Dame et al., 2005). Foams with a controlled liquid fraction, containing a stabilizing agent and able to reduce spore contamination by six logs, have been successfully developed and patented in our laboratory (Faure et al., 2016). These foaming solutions are used with a dedicated foam generator that maintains the foam liquid fraction between 3 to 5%. These long-lifetime foams could be used to statically decontaminate outdoor and indoor facilities and equipment such as ventilation pipes, offices, cold-rooms, trains, and containers. Two ways of use were developed: sprayer application depositing a centimeter-thick layer of the decontamination foam on

accessible contaminated surfaces, or a filling application for all volumes, even facilities difficult to access. Without treatment, all such places could become contamination exchange areas contributing to contamination propagation.

This study measured the disinfectant efficiency of a new biological decontamination foam using hydrogen peroxide as the disinfectant. The work was carried out on both foam and liquid (no air bubbles) forms to determine the decontamination efficiency. In addition, the study gave data related to the negative or positive contribution of each chemical product contained in the solution. For both foam and liquid forms, the decontamination impact from the stabilizer agent was evaluated. Further tests were performed by using the liquid form containing only the hydrogen peroxide. *Bacillus thuringiensis* (Bt) spores, biological indicators for decontamination tests in the field of CBRN Defense, were used for all tests. Moreover, to simulate difficult case of decontamination, all tests were performed on vertical surfaces contaminated with Bt spores. Different contact times and temperatures were tested for each decontamination technologies liquid and foam. Foam formulations with or without stabilizer agent were tested at three temperatures to study how the behavior of the foam is affected by temperature variations.

Materials and methods

Bacterial spore preparation

B. thuringiensis DSM 5815 (provided by Leibniz-Institute DSMZ Co., Braunschweig, Germany) were used for this study, and prepared according to the protocol described by Wood et al. (Wood et al., 2016). Briefly, frozen *B. thuringiensis* was inoculated into 10 mL of lysogeny broth media (LB, Becton Dickinson Co., Sparks, MD) at 30°C for 16-18 hours with continuous agitation at 160 rpm. Aliquots of 150µl were then transferred into fresh media and incubated for 5 hours at 30°C with continuous agitation at 160 rpm. The inoculum was spread onto a nutrient agar [0.5% (w/v) Tryptone, 0.3% (w/v) beef extract, 0.3% (w/v) NaCl, 2% (w/v) agar, 0.01% (w/v) glucose], completed with 10 mL of metal solution [0.025% (w/v) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03% (w/v) CaCl_2 , 0.04% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.004% (w/v) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0025% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 0.0025% (w/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] and incubated at 30°C. The sporulation progression in the petri dishes was checked by optical microscopy after 7-9 days. When the sporulation reached $\geq 95\%$, the spores were harvested from the plates using a rake and sterile distilled water, and washed four times in sterilized water by centrifugation and resuspension (4500 rpm at 4°C, two times 30 minutes, 20 minutes and 15 minutes) to remove cell debris and media co-contaminants. The spore suspension was heat-treated at 70°C for 15 minutes with continuous agitation at 300 rpm. For heat-shock, the heat-treated spores were plunged into ice for 20 minutes and sonicated for 4 minutes at 45 Hz. The final titer of the suspension was determined by 1:10 and 1:5 serial dilutions, prepared using LB media and covered on a petri dish with appropriate solid growth media. The plates were incubated at 30°C overnight before CFU evaluation.

Disinfectant solutions

Five solutions were prepared with or without hydrogen peroxide at 12% (v/v) and with or without Xanthan 0.3% (w/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) and Glucocon 215 UP commercial solution 1.1% (w/v) (BASF Canada Inc., Mississauga, Canada) respectively (Table 1). Solutions containing Glucocon 215UP (*S2*, *S3*, *S4* and *S5* in Table 1) were tested both in the foam and in the liquid form. The solution *S1* was tested only as liquid. A static generator was

used to mix air and foaming solutions to generate foam. A tube filled with glass balls generated the foam just before the coupon treatment. The generator parameters were set to obtain a foam with a liquid fraction between 3 and 6% (volume liquid/volume foam), with an average of 5.5%.

Test materials

Tests were performed with coupons of polystyrene (petri dish polystyrene, Greiner Bio-one Co., Ltd, Frickenhausen, Germany) which is transparent and non-reactive with our disinfectant. The coupons were calibrated at 2.5 cm by 12 cm. Each coupon was sterilized overnight in a chemical bath containing hydrogen peroxide (ANIOS Co., Lille-Hellemmes, France), washed with 70% (v/v) ethanol to remove all disinfectant traces, and stored at 60°C in a sterile container until use.

Disinfection efficiency test on coupon

A bacterial suspension of *B. thuringiensis* spores was prepared in distilled water at a concentration of 10^9 CFU/mL. An aliquot of 100 μ L (10^8 CFU/mL) was inoculated, in droplets, on the surface of each coupon with the help of a micropipette (Figure 1). After inoculation, the coupons were air dried in a biosafety cabinet (2 hours maximum before use).

The inoculated coupons were then immersed in a 50 mL Falcon[®] tube containing approximately 25 mL of foam or 20 mL of liquid solution. The Falcon[®] tubes containing coupon were kept in vertical position at different controlled temperatures: 20°C inside a biosafety cabinet, 30°C inside a climatic chamber and 4°C in a refrigerator, for various times (5, 10, 15, 20, 25 and 35 minutes).

After the incubation each coupon was transferred into a new 50 mL Falcon[®] tube containing 10 mL of neutralizer solution of phosphate buffered saline (PBS) + 0.04% catalase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) to stop the biocide activity. 20 mL of this neutralizer solution were added also to the Falcon[®] tubes containing only the foam (Figure 1).

To isolate the spores from the coupons, each tube was centrifuged at 4500 rpm for 15 min at 4°C. After removing the supernatant, the pellet containing spores was re-suspended with 10 mL of liquid LB. Each Falcon[®] tube containing coupon was incubated for 1 hour at 30°C. Serial dilutions were plated for each Falcon[®] tube in LB media and covered with LB agar. Experiments were performed in duplicate. After drying, the plates were incubated for 18-24h at 30°C and CFU were counted manually.

Disinfection efficiency test without coupon

Bacterial suspension of *B. thuringiensis* at a concentration of 10^9 CFU/mL, was used to test the decontamination efficiency of solutions without coupon. 100 μ L droplets of this suspension were applied directly inside 20 mL of foam or 1 mL of liquid solution inside a 50 mL Falcon[®] at 20°C. After different contact times, these Falcons[®] were treated following the protocol described in Figure 1.

Validation of disinfectant tests

Controls tests were carried out in parallel for each disinfectant test: (1) Blank control: coupons were not inoculated, but decontaminated as the inoculated ones. These coupons were used as control for issue related to cross-contamination during the test. (2) Positive control: each experiment included an assay where the solution did not contain disinfectant (S4 and S5 in Table 1). Protocol described in Figure 1 was followed for both the foam and the liquid form

without disinfectant. These tests indicated the amount of spores transferred in the liquid or in the foam by the coupon and the amount remained adhered on coupon. (3) Recovery of microorganisms: the same tests with solutions *S4* and *S5* were performed without coupon to evaluate the impact of the protocol on the recovery.

Data processing

Recovery rate and \log_{10} reduction (LR) were determined at last three times in duplicate for each preparation. Recovery data were calculated for each preparation with and without coupons following the equation (1):

$$\text{Mean \% recovery} = [\text{Mean } CFU_{pc} / CFU_{spike}] \times 100 \quad (1)$$

where mean CFU_{pc} is the mean of CFU recovered from at last three duplicate positive controls (pc) for each preparation with or without coupons, and CFU_{spike} is the number of CFU spiked (inoculated) on the coupon, or inside the liquid or foam.

Decontamination efficacy for each treatment was calculated to measure the efficacy of the foam treatment in terms of the spore \log_{10} reduction (LR). This was calculated by dividing the number of viable spores extracted after the decontamination tests by the number of spores originally spiked. The decontamination efficacy for biological agents was expressed in terms of a log reduction using the equation (2):

$$\text{Log Reduction (LR)} = \log(CFU_t / CFU_{spike}) \quad (2)$$

where CFU_t is the mean number of viable organisms recovered from either each coupon or the foam or liquid solution used for a test, after decontamination. Test coupons in which no CFU was recovered, were assigned a CFU count of 1, resulting in a log CFU of zero. Standard deviations were calculated from the mean results of the replicated experiments.

For each mean, the standard error of the mean (SEM) was calculated. *Student t* tests were performed using XLStat software (Addinsoft, Paris, France) to determine if two data sets of mean were significantly different from one another. A *p-value* of < 0.05 was considered to be significant.

Evaluation of the rate constant for inactivation and Arrhenius law

In order to evaluate the effects of temperature on the decontamination efficacy for bacterial spores, the rate constant for inactivation k was deduced with a mathematic model based on first-order kinetics:

$$dN/dt = -kN, \text{ or, in the integration form, } \log(N / N_0) = -kt \quad (3)$$

where N_0 is $CFU_{control}$ and N is CFU_t at time t (including time zero). The slope of the linear regression of $\log(N/N_0)$ versus time t is equal to $-k$.

In the Arrhenius equation, k is related to the inactivation energy of each decontamination parameter E_a (kJ.mol⁻¹) (Watanabe et al., 2003) by the equation:

$$k = A_0 e^{(-E_a / RT)}, \text{ or, in the integration form, } \ln k = \ln A_0 - (E_a / RT) \quad (4)$$

where k is the rate constant for inactivation, which is a function of temperature T , A_0 is the frequency factor and R is the gas constant (8.314 J/mol.K⁻¹).

A survival curve for each foam and liquid parameter was plotted for each temperature to measure k . For each foam and liquid parameter, the slope of the linear regression of $\ln k$ versus $1/T$ enabled the determination of E_a/R and A_0 .

Results

Determination of spores recovery inside the foam or liquid solutions in the absence of disinfectant

The spores recovery injected inside foam or liquid forms was determined with *S5* solution that did not contain disinfectant (Table 1). The mean recovery from foam form was higher than the liquid solution with respectively means of 8.03 ± 0.03 log and 7.70 ± 0.10 log, and statistically significant (p-value = 0.01; t-test on mean). This significant difference justifies the amount used in equation (1) ($CFU_{spike} = 10^8$ CFU/mL).

Determination of the spores recovery in the absence of disinfectant on coupon

The recovered amount of spores from coupon (adherent spores) was not statistically different when the coupon was in contact with foam or with liquid solution (p-value = 0.086). Similarly, the fraction of spores recovered inside foam or liquid (transferred spores) was not statistically different (p-value = 0.295). However, the total recovery of these controls was lower than for control tests without coupons. The recovered amount of spores from both adherent and transferred parts was 7.42 ± 0.15 log.

A fraction of bacterial spores was rapidly transferred inside the foam or the liquid solution (Figure 2). Within five minutes, 5% average of the inoculated bacterial spores were transferred inside the liquid solution. For the transfer within foam, ten minutes were needed to obtain 3% of the spores transferred. After twenty minutes, the quantity transferred from coupon to foam or liquid solution did not change and stabilized at 5%. Moreover, the total foam recoveries were always higher than the total liquid solution recoveries. After 25 minutes of treatment with our foam, 90% of spores still adhered on the surface. The surface was considered still contaminated with more than 10^7 CFU. This value is considered dangerous for human health in the case of spores from bacterial pathogens.

Decontamination efficiency on coupon at room temperature

To compare the decontamination efficiency on vertical surface between foam and liquid containing disinfectant, reaction inactivation kinetics were performed (*S1*, *S2* and *S3* in Table 1). Experiments in liquid solutions enabled to characterize the effect of the foaming surfactant (Glucopon 215UP) and stabilizing agent (Xanthan) on the inactivation kinetic (LR) (Figure 3). After twenty-five minutes of contact time in a vertical position, the adhered spores on the coupons were not completely inactivated. The decontamination efficiency ranged from 3.68 log for the liquid solution without additive (*S1*), to 4.47 log for the liquid solution with all additives (*S3*). The decontamination kinetic of liquid solutions on spores adherent to the coupon can be seen in Figure 3, with the lines for first-order kinetic-model (Murdoch et al., 2016). The equation of these lines enabled the determination of the inactivation coefficients for each treatment at “room temperature” (equal 293.15K and 20°C). The model did fit satisfactorily the result of each treatment, with R^2 ranging from 0.94 to 0.98. Nevertheless, as can be seen in

Table 2, no positive effect of Glucopon and Xanthan (*S3*) was revealed (difference not statistically significant compared to other treatments (*S1* and *S2*) (p -value > 0.05)).

Figure 4 shows the LR as a function of time, for solutions containing hydrogen peroxide *S2* and *S3* in the both forms: liquid and foam. The same statistical model used for the liquid solution (Figure 3), was applied to determine the inactivation coefficients at “room temperature”. This model fitted correctly with the results, with R^2 of 0.96 and 0.98 for the decontamination foam without (*S2*) and with stabilizing agent (*S3*) respectively. Using foam with an average of 5.5% of liquid fraction was enough to satisfactorily wet the surface with a liquid film that enables the spores to be inactivated. Also, the decontamination efficacy kinetic for both decontamination foams was almost similar and after twenty-five minutes of contact time, the mean LR was equal for both (4.5 log). However, after 45 minutes of contact time no CFU were retrieved on the surface of the coupons.

The inactivation coefficients ($k\ s^{-1}$) of the spores transferred inside the foam were 0.209 with stabilizing agent (*S3*) and 0.288 without (*S2*). However, control tests with solutions *S4* and *S5* showed that only 5% of the bacterial spores were transferred within the foam after twenty-five minutes of contact time. The decontamination kinetic inside foam with (*S3*) and without (*S2*) the stabilizing agent was not statistically different (p -value > 0.05). After twenty-five minutes, the decontamination was not completed in both foam fractions, but no CFU were retrieved after at least 35 minutes from the foam fractions even if they were found on the coupon (data not shown).

Decontamination efficiency at different temperatures

To determine the effect of the temperature on decontamination efficacy, the spore inactivation was assessed at three temperatures after twenty-five minutes of exposure. This efficacy was evaluated for solution *S3* in the foam and liquid form. At the lowest temperature ($4^{\circ}\text{C} = 277.15\ \text{K}$) the values of LR were very low and ranged from 1.44 to 2.25 LR (Figure 5). Cold temperatures drastically slowed down the decontamination kinetic on surface. On the contrary, a different behavior was found at higher temperature ($30^{\circ}\text{C} = 303.15\ \text{K}$). The LR results were different between the decontamination by foam and by liquid solution. For the foam, no bacterial spores were recovered on coupon after twenty-five minutes of contact time at 303.15 K, at the limit of detection. For the liquid solution, after the same contact time, the bacterial spore recovery was nearly 5.5 LR. The difference between both forms (foam and liquid solution) at 303.15 K was statistically significant (p -value > 0.05).

Activation energy of foams *S2* and *S3* (Arrhenius law)

The activation energy was determined for foams *S2* and *S3*. For this comparison, CFU control (CFU_{pc}) were used to calculate LR. To determine if results were fitted by the Arrhenius law, the reciprocal of absolute temperature was plotted as a function of the natural logarithm of the inactivation coefficient (Figure 6). The two foam curves were fitted by the Arrhenius law. The activation energies ranged from $46.85\ \text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for foam without stabilizing agent (*S2*) to $67.55\ \text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ for foam with stabilizing agent (*S3*).

Discussion

The efficiency to decontaminate *Bacillus thuringiensis* spore had already been proven for the described, newly patented, foam containing hydrogen peroxide. This efficiency was particularly tested on horizontal coupons (Faure et al., 2016). Hydrogen peroxide was selected as disinfectant for its antibacterial and sporicidal activity, and for its surface- and additive-friendly characteristics (Sagripanti and Bonifacino, 1999; Melly et al., 2002; Raber and Burkland, 2010; Eryilmaz et al., 2016). The hydrogen peroxide was known to be neutralized by catalase positive bacteria (McDonnell and Russell, 1999; Pottage et al., 2012). However, previous studies had shown that with high hydrogen peroxide concentration and a sufficient contact time this bacterial defense can be overwhelmed (Otter and French 2009, Rios-Castillo et al., 2017). Recently in our laboratory, the Xanthan foam described in this study was already successfully tested on different bacteria used in French standard NF T 72-194: *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* (data not shown). Moreover, the sporicidal capacity of this foam was checked on horizontal surface on *Bacillus thuringiensis*, *Geobacillus stearothermophilus* (biological indicator for biosafety level 3 decontamination) and *Bacillus anthracis* (biological weapon). The foam enabled to reduce more than 6 log of these spores in 30 minutes of contact time on horizontal coupons (data not shown). Therefore, in this paper we investigate the decontamination behavior of this new foam solution with coupons in a vertical position.

Firstly, the formulation impact on the decontamination efficiency had been validated by experiments on liquid solution. The surfactant agent (Glucopon) enables the generation of a foam with an appropriate generator. The use of a stabilizing agent (Xanthan) in the foam allows the achievement of a sufficient contact time for decontamination in vertical position and by filling (Dame et al., 2005). Indeed, Dame et al. already showed the increase of a radiological decontamination foam stability and the duration of the wetting film on the wall. This effect is attributed to presence of Xanthan which delays the beginning of the drainage and after decreases the drainage kinetic. Moreover, our results proved that both products, Glucopon and Xanthan, have no negative impact on the decontamination efficiency of hydrogen peroxide. The comparison of results revealed that the disinfectant quantity in the foam with liquid fraction at 5.5%, is sufficient to obtain the same decontamination efficiency measured for the liquid solution. Thus, the wetting-film from a foam with a liquid fraction of average 5.5% is thick enough to wet the spore layer on the coupon to decontaminate. Furthermore, at this liquid fraction of the foam, only 5.5 L of liquid solution were needed to produce 100 L of foam. Therefore the quantity of effluent is also considerably reduced at the end of treatment compared to liquid solution treatment, for the same efficiency. Moreover, the Xanthan foam process is advantageous due to the sticking properties of the stabilizing agent in the foam. This one ensures a sufficient contact time in vertical position to neutralize all spores (spores reduction of 8 log for 45 minutes in this study). Thus, it is not necessary to apply the solution several times to ensure the manufacturer's recommended contact times for vertical decontamination (Edmonds et al., 2014; Environmental Protection Agency, 2010). All these results in vertical position show that the foam could neutralized spores below one hour and could be adapted to decontaminate rapidly sites where access is difficult, for example pipes, ceiling, walls with or without crevices, and areas behind equipment.

Most studies based on liquid and foam decontamination process were performed between 20 and 24°C (293 K to 297 K) (Young and Setlow, 2004; Ryan et al., 2014) or "room temperature" (Rogers et al., 2005; Eryilmaz et al., 2016). For certain studies the experimental temperature has not been described (Andersen et al., 2006; Gonzalez et al., 2015). Whereas some papers

advised to take this parameter into account for the evaluation of the decontamination efficiency (Russell, 1990; Edmonds et al., 2014). The influence of temperature on the decontamination efficiency of our foam is studied. Indeed, this foam could be used at different temperatures especially for the decontamination of outdoor sites ($4^{\circ}\text{C} = 277.15\text{ K}$ and $30^{\circ}\text{C} = 303.15\text{ K}$). The results show the decontamination kinetic of our hydrogen peroxide foam increases with raising temperatures. This observation is coherent with another foam preparation containing sodium hypochlorite (Guan et al., 2013) and other works on liquid hydrogen peroxide on horizontal surface (Hilgren et al., 2007). However, to our knowledge, this is the first time that a foam containing hydrogen peroxide is studied at these temperatures and in vertical surface. At 30°C the foam neutralized all bacterial spores after 25 minutes of contact time in a vertical position. However, the reaction inactivation kinetic is not linear with the increase of temperatures. At this temperature, the viscosity decrease speeds up and seems to produce a positive effect on the drainage inside the wetting film directly in contact with the spores. This effect enables the detachment of bacterial spores, which are neutralized inside the foam, as well as the disinfectant replenishment. This hydrodynamic effect is not found for liquid treatment, which is more static. This effect could explain the difference between foam and liquid solution efficiency when the temperature increases.

At 4°C the foam did not enable complete decontamination of the surface in 25 minutes. As the foam reaction follows the Arrhenius law, the decontamination kinetic can be predicted at any temperature. Therefore, it is possible to adapt the contact time between the foam and the contamination. A contact time of 2h30 at 4°C appears to be required to reach 8 log of reduction of spores. The adherent properties of the foam and the stabilizing agent ensure a sufficient wetting film thickness during this contact time. Thus, using the Arrhenius law, it is possible to adjust the contact time depending on the environmental temperature for the best use of the foam. For example, to decontaminate a vehicle in a garage, it is possible to calculate the contact time required, depending on the ambient temperature in different seasons (Andersen et al., 2006). In conclusion, the temperature plays a role in decontamination efficiency kinetic and should be taken into account before carrying out the assays, especially to compare the efficiency of different products (Wood et al., 2011).

In addition, this study demonstrated that bacterial spores were not only decontaminated on the coupon but also after being transferred inside the foam thanks to the wetting film. Previous studies have already discussed the complex issues of biological sampling and recovery from surfaces after testing (Rastogi et al., 2009; Tomasino et al., 2010; Edmonds et al., 2014). Tomasino et al. found that recovery from different materials ranged from approximately 20 to 70%. They studied the recovery from three different fractions. The first fraction remains on the sampling tool surfaces, i.e. tube. A second one was not retrieved, due to spore adhesion to the surface matrix. Finally, the third fraction corresponded to the spores retrieved from a coupon by sampling tools. These three fractions correspond well to those analyzed here by the recovery tests with and without coupons. However in our study, we measured also the amount of spores detached from the coupon and transferred within the foam. Even if there is a high rate of spore adhesion to the surface, the spore upper layer is transferred inside the foam by the wetting film. After 20 minutes, the fraction of spores transferred in the foam reached a maximum (Figure 2). However, all spores transferred into the foam are neutralized after 35 minutes with disinfectant. Finally, a recovery difference was also found between foam and liquid solutions. For the foam, the recovery is higher than the liquid solution. It would appear that the foam bubbles could facilitate the capture of hydrophobic spores, due to the attachment of the spores to the air-liquid interface. Consequently, the liquid effluents are safe after 35 minutes foam treatment, avoiding the contamination of other surfaces.

Major foam decontamination properties have been highlighted in this study. First, the formulation's stability, wetting, and hydrodynamic properties improve the decontamination effects on adherent spore. Secondly, the foam process allows to inactivate the transferred spores into the foam. Finally, the temperature plays a key role on the decontamination kinetic and should be taken into account to compare the efficiency of disinfectants. This process was developed in context of CBRN-E Defense sector because it could treat large and complex shape facilities in case of biological attack or accident. But it could be useful also for other applications i.e. hospital, food, as can be seen from the many articles published on this topic (Benga et al., 2017; Mott et al., 2017; Szabo et al., 2017).

Author Contributions

EL, FG, NO and SF designed and supervised the study; EL, FG and SF designed experiments; EL performed experiments; EL, FG and SF analyzed data; EL, FG, NO and SF wrote the manuscript.

Acknowledgments

We thank our lab members for helpful discussions.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

This work was jointly funded by the inter-ministerial program of R&D against CBRNE risks and the Normandy Region.

References

- Andersen, B.M., Rasch, M., Hochlin, K., Jensen, F.H., Wismar, P., and Fredriksen, J.E. (2006). Decontamination of rooms, medical equipment and ambulances using an aerosol of hydrogen peroxide disinfectant. *J. Hosp. Infect.* 62, 149-155. doi: 10.1016/j.jhin.2005.07.020.
- Benga, L., Benten, W.P.M., Engelhardt, E., Gougoula, C., Schulze-Robbeke, R., and Sager, M. (2017). Survival of bacteria of laboratory animal origin on cage bedding and inactivation by hydrogen peroxide vapour. *Lab. Animals* 51, 412-421. doi: 10.1177/0023677216675386.
- Dame, U., Fritz, C., Pitois, O., and Faure, S. (2005). Relations between physicochemical properties and instability of decontamination foams. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 263, 210-218. doi: 10.1016/j.colsurfa.2004.12.053.
- Doona, C.J., Feeherry, F. E., Kustin, K., Olinger, G. G., Setlow, P., Malkin, A. J., Leighton, T. (2015). Fighting Ebola with novel spore decontamination technologies for the military. *Front. Microbiol.* 6, 663. doi: 10.3389/fmicb.2015.00663.
- Driks, A. (1999). Bacillus subtilis spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 1–20.
- Driks, A. (2002a). Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. *Trends Microbiol.* 10, 251-254. doi 10.1016/S0966-842x(02)02373-9.

- Driks, A. (2002b). Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell.Mol. Life Sci.* 59, 389-391. doi: DOI 10.1007/s00018-002-8430-x.
- Edmonds, J.M., Sabol, J.P., and Rastogi, V.K. (2014). Decontamination efficacy of three commercial-off-the-shelf (COTS) sporicidal disinfectants on medium-sized panels contaminated with surrogate spores of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* 9, e99827. doi: 10.1371/journal.pone.0099827.
- Environmental Protection Agency (2006). Evaluation of Spray-Applied Sporicidal Decontamination Technologies. EPA/600/R-06/146.
- Environmental Protection Agency (2010). Biological Agent Decontamination Technology Testing. EPA/600/R-10/087.
- Eryilmaz, M., Kaskatepe, B., Kiyimaci, M.E., Erol, H.B., Simsek, D., and Gumustas, A. (2016). In vitro antimicrobial activity of three new generation disinfectants. *Trop. J. Pharm. Res.* 15, 2191-2195. doi: 10.4314/tjpr.v15i10.18.
- Faille, C., Benezech, T., Midelet-Bourdin, G., Lequette, Y., Clarisse, M., Ronse, G., et al. (2014). Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: a potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol.* 40, 64-74. doi: 10.1016/j.fm.2013.12.004.
- Faure, S., Le Toquin, E., and Gas, F. (2016). *Disinfecting aqueous foam, process for preparing same and use thereof*. Publication No WO2016202879. France patent application.
- Fernandes, M.D., Alvares, A.C.C., Manoel, J.G.M., Esper, L.M.R., Kabuki, D.Y., and Kuaye, A.Y. (2017). Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical sanitation procedures. *Int. Dairy J.* 72, 23-28. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.03.016.
- Genest, P.C., Setlow, B., Melly, E., and Setlow, P. (2002). Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxyxynitrite appears to be caused by membrane damage. *Microbiol.* 148, 307-314. doi: 10.1099/00221287-148-1-307.
- Gonzalez, E.A., Nandy, P., Lucas, A.D., and Hitchins, V.M. (2015). Ability of cleaning-disinfecting wipes to remove bacteria from medical device surfaces. *Am. J. Infect. Control.* 43, 1331-1335. doi: 10.1016/j.ajic.2015.07.024.
- Guan, J., Chan, M., Brooks, B.W., and Rohonczy, L. (2013). Influence of temperature and organic load on chemical disinfection of *Geobacillus stearothermophilus* spores, a surrogate for *Bacillus anthracis*. *Can. Vet. J.* 77, 100-104.
- Higgins, D., and Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 131-148. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.
- Hilgren, J., Swanson, K.M.J., Diez-Gonzalez, F., and Cords, B. (2007). Inactivation of *Bacillus anthracis* spores by liquid biocides in the presence of food residue. *Appl. Microbiol.* 73, 6370-6377. doi: 10.1128/Aem.00974-07.
- Kenters, N., Huijskens, E.G.W., de Wit, S.C.J., van Rosmalen, J., and Voss, A. (2017). Effectiveness of cleaning-disinfection wipes and sprays against multidrug-resistant outbreak strains. *Am J Infect Control.* 45, E69-E73. doi: 10.1016/j.ajic.2017.04.290.
- Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P., and Maillard, J.Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *J. Appl. Microbiol.* 113, 485-498. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x.
- Loshon, C.A., Melly, E., Setlow, B., and Setlow, P. (2001). Analysis of the killing of spores of *Bacillus subtilis* by a new disinfectant, Sterilox. *J. Appl. Microbiol.* 91, 1051-1058.
- McDonnell, G., and Russell, A.D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 147-179.

- Melly, E., Cowan, A.E., and Setlow, P. (2002). Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.* 93, 316-325. doi: DOI 10.1046/j.1365-2672.2002.01687.x.
- Moeller, R., Setlow, P., Reitz, G., and Nicholson, W.L. (2009). Roles of small, acid-soluble spore proteins and core water content in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to environmental solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5202-5208. doi: 10.1128/AEM.00789-09.
- Mott, T.M., Shoe, J.L., Hunter, M., Woodson, A.M., Fritts, K.A., Klimko, C.P., et al. (2017). Comparison of sampling methods to recover germinated *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis* endospores from surface coupons. *Appl. Microbiol.* 122, 1219-1232. doi: 10.1111/jam.13418.
- Murdoch, L.E., Bailey, L., Banham, E., Watson, F., Adams, N.M.T., and Chewins, J. (2016). Evaluating different concentrations of hydrogen peroxide in an automated room disinfection system. *Letters in Appl. Microbiol.* 63, 178-182. doi: 10.1111/lam.12607.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., and Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548-572. doi: 10.1128/Mmbr.64.3.548-572.2000.
- Otter, J.A., and French, G.L. (2009). Survival of Nosocomial Bacteria and Spores on Surfaces and Inactivation by Hydrogen Peroxide Vapor. *J. Clin. Microbiol.* 47, 205-207. doi: 10.1128/Jcm.02004-08.
- Piggot, P.J., and Hilbert, D.W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Cur. Opin. Microbiol.* 7, 579-586. doi: 10.1016/j.mib.2004.10.001.
- Pottage, T., Macken, S., Walker, J.T., and Bennett, A.M. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* is more resistant to vaporized hydrogen peroxide than commercial *Geobacillus stearothermophilus* biological indicators. *J. Hosp. Infec.* 80, 41-45. doi: 10.1016/j.jhin.2011.11.001.
- Raber, E., and Burklund, A. (2010). Decontamination Options for *Bacillus anthracis*-Contaminated Drinking Water Determined from Spore Surrogate Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6631-6638. doi: 10.1128/Aem.01136-10.
- Rastogi, V.K., Wallace, L., Smith, L.S., Ryan, S.P., and Martin, B. (2009). Quantitative method to determine sporicidal decontamination of building surfaces by gaseous fumigants, and issues related to laboratory-scale studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3688-3694. doi: 10.1128/AEM.02592-08.
- Riesenman, P.J., and Nicholson, W.L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 620-626. doi: 10.1128/Aem.66.2.620-626.2000.
- Rios-Castillo, A.G., Gonzalez-Rivas, F., and Rodriguez-Jerez, J.J. (2017). Bactericidal Efficacy of Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria on Stainless Steel Surfaces. *J. Food Sci.* 82, 2351-2356. doi: 10.1111/1750-3841.13790.
- Rogers, J.V., Sabourin, C.L., Choi, Y.W., Richter, W.R., Rudnicki, D.C., Riggs, K.B., Taylor, M.L., and Chang, J. (2005). Decontamination assessment of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, and *Geobacillus stearothermophilus* spores on indoor surfaces using a hydrogen peroxide gas generator. *J. Appl. Microbiol.* 99, 739-748. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02686.x.
- Ryan, S.P., Lee, S.D., Calfee, M.W., Wood, J.P., McDonald, S., Clayton, M., et al. (2014). Effect of inoculation method on the determination of decontamination efficacy against *Bacillus* spores. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 30, 2609-2623. doi: 10.1007/s11274-014-1684-2.

- Russell, A.D. (1990). Bacterial Spores and Chemical Sporicidal Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 99-119.
- Sagripani, J.L., and Bonifacino, A. (1999). Bacterial Spores Survive Treatment with Commercial Sterilants and Disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4255–4260.
- Schmitt, K., and Zacchia, N.A. (2012). Total decontamination cost of the anthrax letter attacks. *Bio Secur Bioterror* 10, 98-107. doi: 10.1089/bsp.2010.0053.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., and Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins. *J. Bacteriol.* 188, 3740-3747. doi: 10.1128/JB.00212-06.
- Setlow, P. (1992). I Will Survive - Protecting and Repairing Spore DNA. *J. Bacteriol.* 174, 2737-2741.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514-525. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x.
- Szabo, J.G., Meiners, G., Heckman, L., Rice, E.W., and Hall, J. (2017). Decontamination of *Bacillus* spores adhered to iron and cement-mortar drinking water infrastructure in a model system using disinfectants. *J. Environ. Manag.* 187, 1-7. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.11.024.
- Tennen, R., Setlow, B., Davis, K.L., Loshon, C.A., and Setlow, P. (2000). Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *J. Appl. Microbiol.* 89, 330-338.
- Tomasino, S.F., Rastogi, V.K., Wallace, L., Smith, L.S., Hamilton, M.A., and Pines, R.M. (2010). Use of Alternative Carrier Materials in AOAC Official Method(SM) 2008.05, Efficacy of Liquid Sporicides Against Spores of *Bacillus subtilis* on a Hard, Nonporous Surface, Quantitative Three-Step Method. *J. AOAC Int.* 93, 259-276.
- van Bokhorst-van de Veen, H., Xie, H., Esveld, E., Abee, T., Mastwijk, H., and Nierop Groot, M. (2015). Inactivation of chemical and heat-resistant spores of *Bacillus* and *Geobacillus* by nitrogen cold atmospheric plasma evokes distinct changes in morphology and integrity of spores. *Food Microbiol.* 45, 26-33. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.018.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H., and Yamasaki, M. (2003). Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores by High-Pressure Carbon Dioxide Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7124-7129. doi: 10.1128/aem.69.12.7124-7129.2003.
- Wood, J.P., Calfee, M.W., Clayton, M., Griffin-Gatchalian, N., Touati, A., Ryan, S., et al. (2016). A simple decontamination approach using hydrogen peroxide vapour for *Bacillus anthracis* spore inactivation. *J. Appl. Microbiol.* 121, 1603-1615. doi: 10.1111/jam.13284.
- Wood, J.P., Choi, Y.W., Rogers, J.V., Kelly, T.J., Riggs, K.B., and Willenberg, Z.J. (2011). Efficacy of liquid spray decontaminants for inactivation of *Bacillus anthracis* spores on building and outdoor materials. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1262-1273. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04980.x.
- Wood, J.P., Meyer, K.M., Kelly, T.J., Choi, Y.W., Rogers, J.V., Riggs, K.B., et al. (2015). Environmental Persistence of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* Spores. *PLoS One* 10, e0138083. doi: 10.1371/journal.pone.0138083.
- Yi, Y., Hao, L.M., Ma, S.R., Wu, J.H., Wang, T., Lin, S., et al. (2016). A pilot study on using chlorine dioxide gas for disinfection of gastrointestinal endoscopes. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B* 17, 526-536. doi: 10.1631/jzus.B1500327.

Young, S.B., and Setlow, P. (2004). Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by Decon and Oxone™, two general decontaminants for biological agents. *J. Appl. Microbiol.* 96, 289-301. doi: 10.1046/j.1365-2672.2004.02159.x.

Tables

Solution		Formula
<i>S1</i>	12%	Hydrogen peroxide
<i>S2</i>	12%	Hydrogen peroxide
	1.1%	Glucopon 215 UP
<i>S3</i>	12%	Hydrogen peroxide
	1.1%	Glucopon 215 UP
	0.3%	Xanthan
<i>S4</i>	1.1%	Glucopon 215 UP
<i>S5</i>	1.1%	Glucopon 215 UP
	0.3%	Xanthan

Table 1. Tested solutions formulated with Hydrogen peroxide, Xanthan and Glucopon 215 UP. Values are presented in percentages (volume/volume for hydrogen peroxide et weight/volume for Glucopon and Xanthan)

Treatment	Constant inactivation k (s ⁻¹)
Foam: H ₂ O ₂ with Glucopon and Xanthan (<i>S3</i> in foam form)	0.1927
Foam: H ₂ O ₂ with Glucopon and without Xanthan (<i>S2</i> in foam form)	0.1848
Liquid: H ₂ O ₂ with Glucopon and Xanthan (<i>S3</i> in liquid form)	0.1715
Liquid: H ₂ O ₂ with Glucopon and without Xanthan (<i>S2</i> in liquid form)	0.1427
Liquid: H ₂ O ₂ solution without Glucopon and without Xanthan (<i>S1</i>)	0.1503

Table 2. The constant inactivation rate k for adherent spores on coupon, in accordance with different treatments at 293.15 K (20°C)

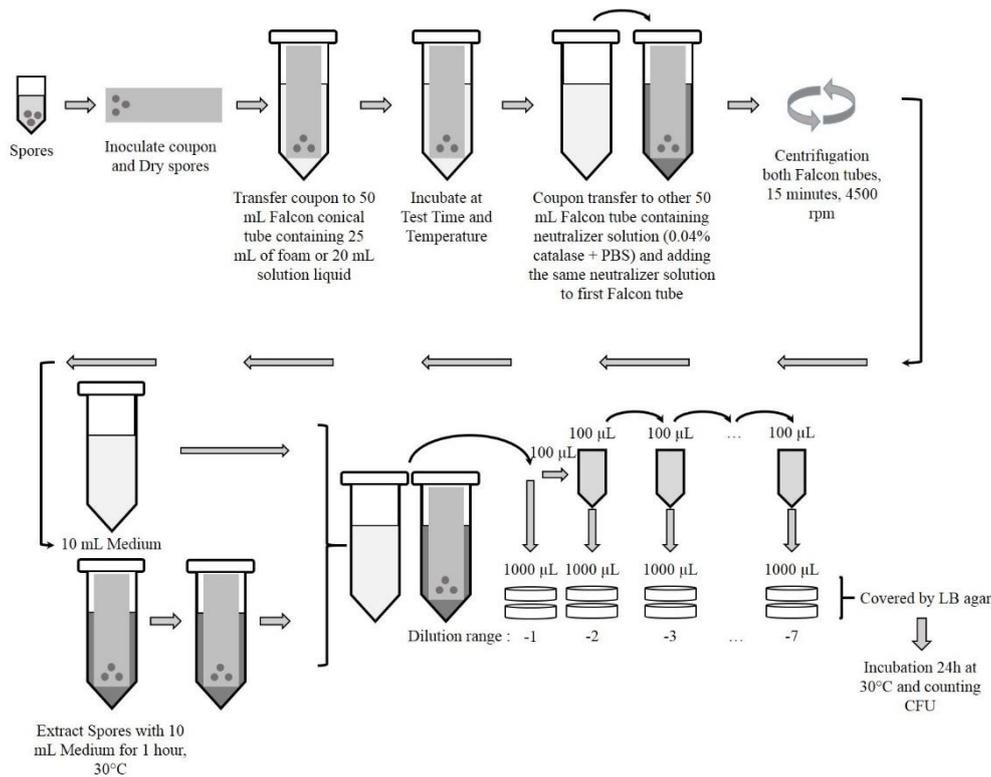


Figure 1: Step-by-step diagram of the foam and liquid solution decontamination method.

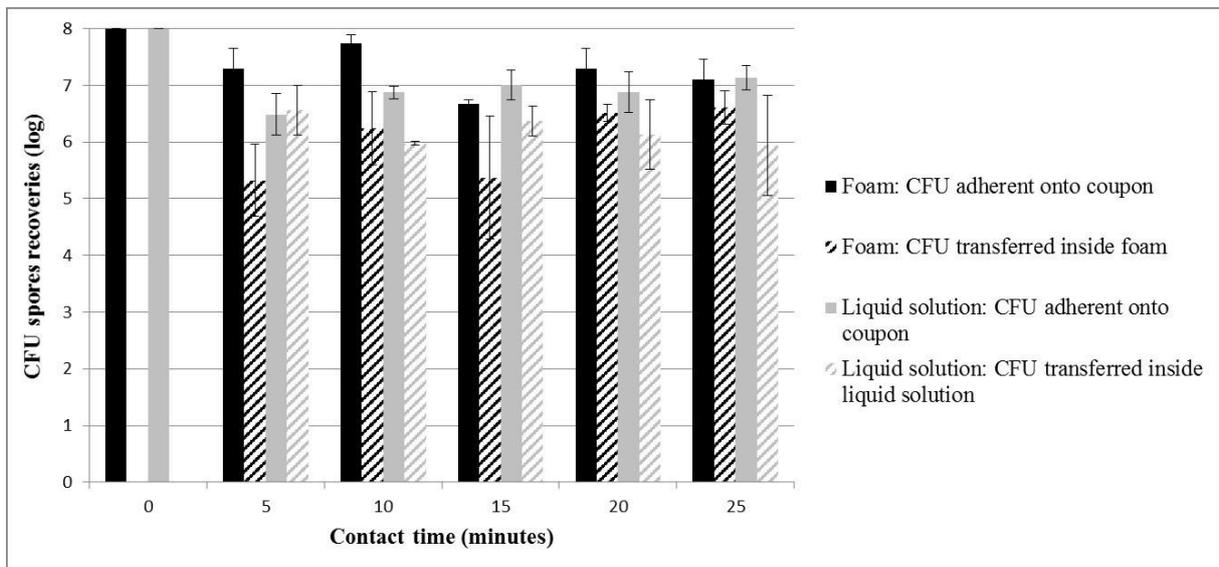


Figure 2. Mean log CFU (\pm SD) for tests without disinfectant (solution S5 in Table 1); foam form: (A) adherent on coupons (■) and (B) transferred inside foam (=); liquid solution: (C) adherent on coupons (■) and (D) transferred inside liquid solution (=), at various contact times and room temperature. CFU: colony forming units.

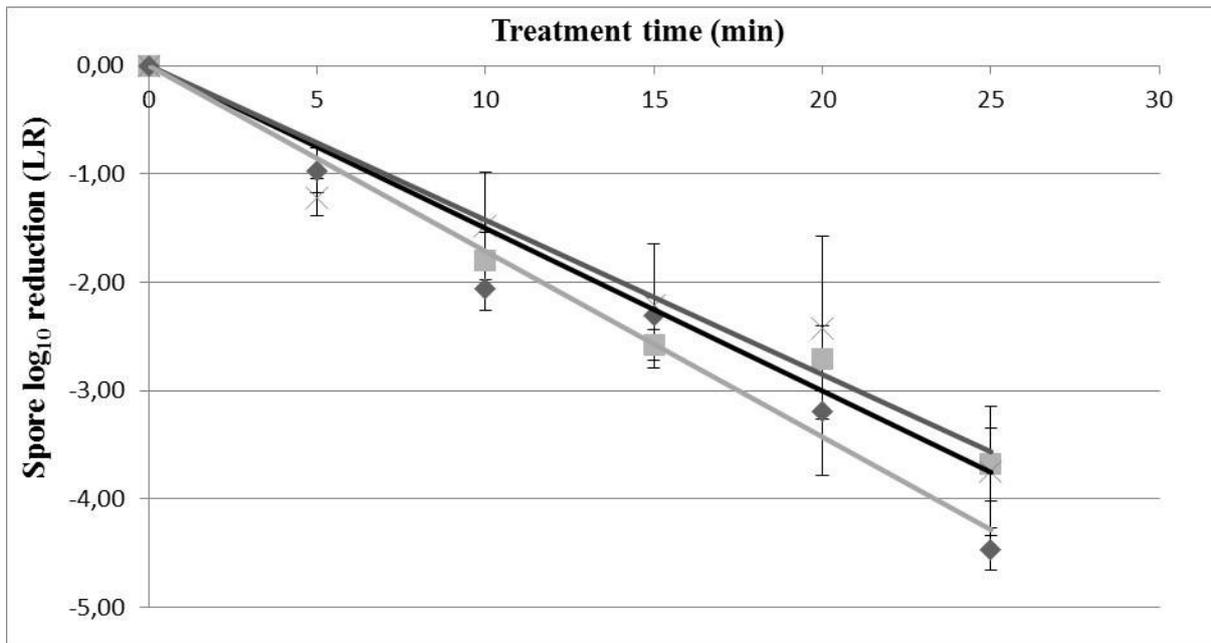


Figure 3. Spore survival adherent on coupon curves, at 293.15 K (20°C) at different contact times; (A) Solution H₂O₂ with Glucocon and Xanthan (S3) in liquid form (R²=0.98) (◆); (B) Solution H₂O₂ (S2) with Glucocon without Xanthan in liquid form (R²=0.94) (X); (C) Solution H₂O₂ without Glucocon and Xanthan (S1) in liquid form (R²=0.96) (■); unbroken lines for first-order kinetics

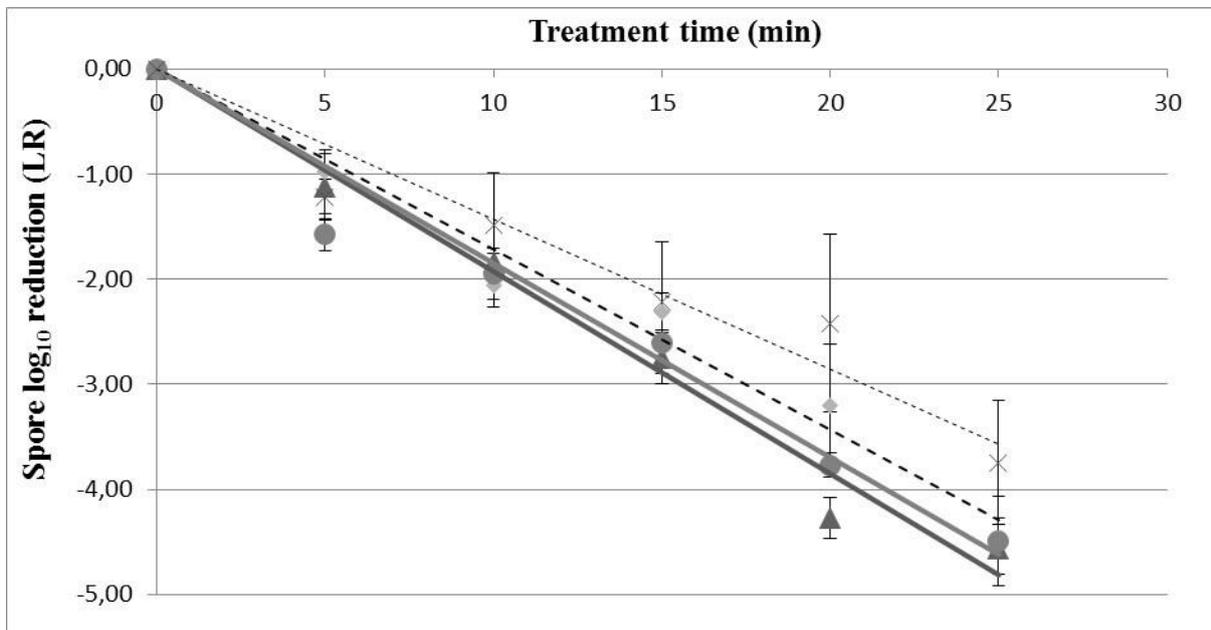


Figure 4. Spore survival adherent on coupon curves, at 293.15 K (20°C) at different contact times; (A) Solution H₂O₂ with Glucocon and Xanthan (S3) in foam form (R²=0.98) (▲); (B) Solution H₂O₂ with Glucocon and Xanthan (S2) in foam form (R²=0.96) (●); (C) Solution H₂O₂ with Glucocon and Xanthan (S3) in liquid form (R²=0.98) (◆); (D) Solution H₂O₂ (S2) with Glucocon without Xanthan in liquid form (R²=0.94) (X); unbroken lines for first-order kinetics for foam and broken lines for first-order kinetics for liquid solution

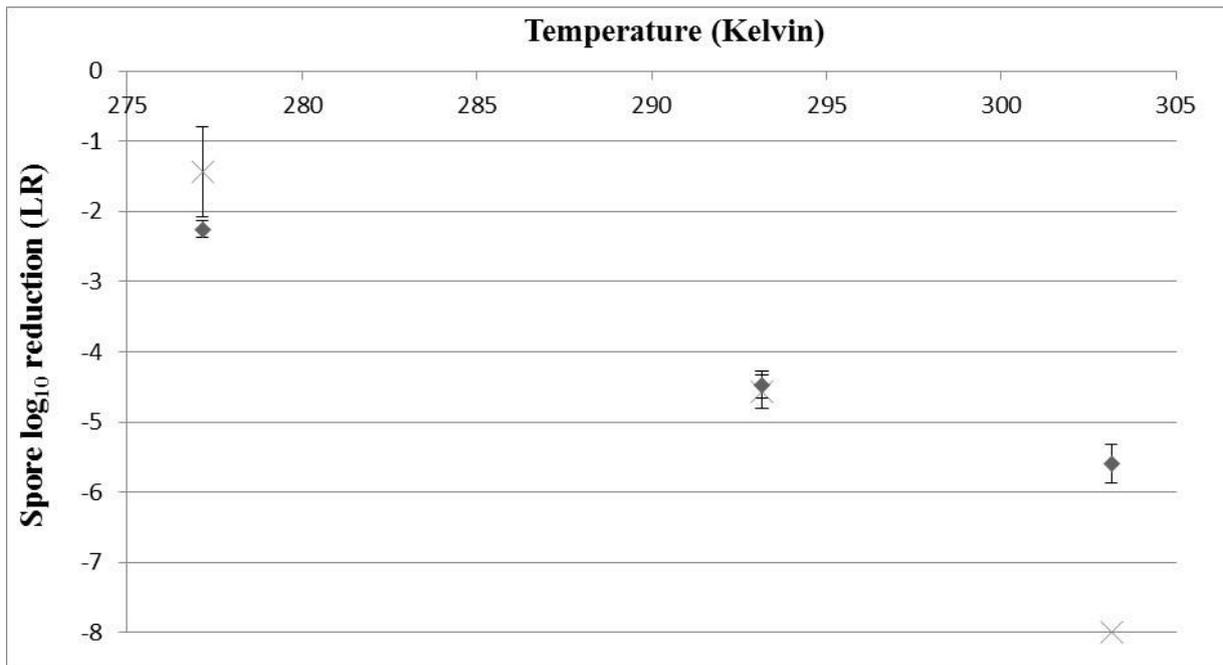


Figure 5. Spore survival adherent on coupon curves, at different temperatures after 25 minutes of contact time; (A) Solution H₂O₂ with Glucopon and Xanthan (S3) in foam form (X); (B) Solution H₂O₂ with Glucopon and Xanthan (S3) in liquid form (♦) unbroken lines for foam and broken lines for liquid solution

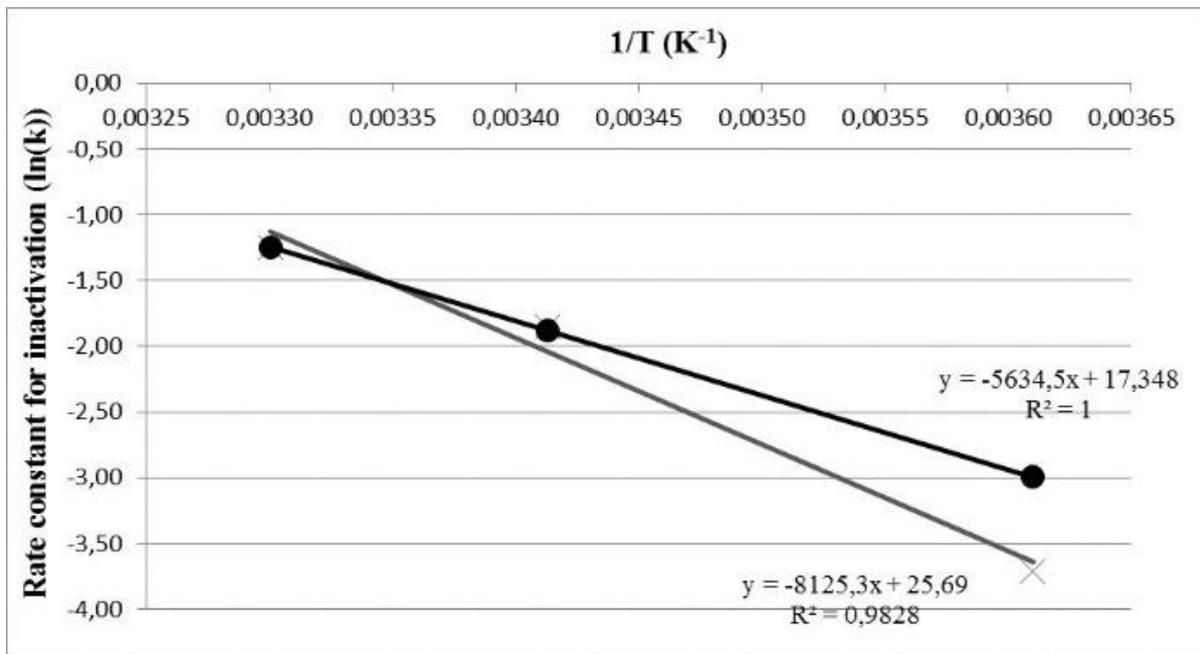


Figure 6. Effect of temperature on Arrhenius plots of the rate constant for spore inactivation; (A) Foam H₂O₂ with Glucopon and Xanthan (X); (B) Foam H₂O₂ with Glucopon and without Xanthan (●); unbroken lines for first-order kinetics for foam

Annexe 2

Evaluation des performances de décontamination après vieillissement des solutions moussantes.

Avant l'utilisation de la solution moussante pour générer de la mousse, il est possible que celle-ci reste en stockage un certain temps dans différents lieux comme des entrepôts. Ces zones de stockage sont soumises aux conditions météorologiques avec de possibles variations de températures. Les solutions moussantes contenant ou non les désinfectants peuvent alors subir des modifications chimiques impactant la moussabilité ou l'efficacité du désinfectant. Nous avons donc mis en place une campagne d'essais sur 14 semaines où les solutions moussantes NaOCl 5%, H₂O₂ 12% et neutre contenant le Glucocon® et le Xanthane, sont stockées à trois températures distinctes : 4°C en chambre froide, 40°C en étuve et à température ambiante. L'influence de la température sur les solutions moussantes stockées a été étudiée sur trois matériaux : l'aluminium, le polystyrène et la faïence, suivant le protocole H (voir partie 2.2.2.1.1.).

- Préparation des solutions moussantes et leur mode de vieillissement :

Pour ces essais, nous avons préparé une quantité suffisante de solution liquide de NaOCl 5%, H₂O₂ 12% et neutre à 3 g/L de Xanthane. Pour cela, 84 flacons en verre de 500 mL vides ont été stérilisés ainsi que 20 litres d'eau distillée. Ensuite sous hotte, 5,5g de Glucocon® sont ajoutés dans chaque flacon stérile vide avec 167 mL d'une solution de Xanthane à 9 g/L. Pour les solutions neutres, 328 mL d'eau distillée stérile sont introduits dans 28 flacons en plus du Glucocon® et Xanthane. Pour les solutions H₂O₂, un volume de 200 mL de H₂O₂ à 30% est ajouté dans 28 flacons avec 128 mL d'eau distillée stérile. Pour les solutions NaOCl, nous avons ajouté 179 mL de NaOCl à 14% avec 149 mL d'eau distillée stérile. Les bouteilles contenant la solution d'H₂O₂ sont recouvertes de papier aluminium pour les protéger de la lumière. La répartition des bouteilles est de 9 de H₂O₂, 9 de NaOCl et 9 de solution neutre pour chaque température. Les bouteilles sont stockées à trois températures : en chambre froide à 4°C, en étuve à 40°C et à température ambiante dans un endroit non exposé au soleil.

- Protocole d'évaluation d'efficacité de décontamination :

Des essais après un certain temps de vieillissement des solutions moussantes sont réalisés afin d'évaluer l'efficacité de décontamination sur supports en aluminium, faïence et

polystyrène par les mousses correspondantes. Le protocole expérimental est le protocole H (partie 2.2.2.1.1.). La génération des mousses a été réalisée le lendemain de la préparation des solutions liquides, puis après 2 semaines, 7 semaines, 9 semaines et 14 semaines de vieillissement. Pour chaque durée de stockage l'ensemble des solutions a été testé pour chaque température et sur les trois matériaux en triplicat.

- Evaluation des caractéristiques physico-chimiques de la solution moussante :

Une évaluation visuelle des mousses a été réalisée à chaque génération. Ainsi, nous avons pu déterminer comme critère qu'une solution liquide permet ou non la génération d'une mousse et si morphologiquement la mousse semble identique ou non à une mousse fraîche. De plus, la fraction liquide a été mesurée pour toutes les mousses générées.

Enfin, nous avons titré la quantité de désinfectant présent dans la solution liquide avant génération de la mousse. Pour la titration du peroxyde d'hydrogène, nous avons mis dans une pipette du permanganate de potassium de concentration à 2×10^{-2} mol/L. Dans une fiole placée dessous, nous avons mélangé 10 ml de la solution liquide de H_2O_2 diluée $1/10^{\text{ième}}$, 20 mL d'eau distillée et 10 mL d'acide sulfurique à 1 mol/L. Le permanganate de potassium est introduit dans la fiole jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante de la solution contenant H_2O_2 . Le volume de permanganate de potassium introduit dans la fiole permet de remonter jusqu'au pourcentage de peroxyde d'hydrogène présent dans la solution suivant le calcul :

$$C_{\text{molaire}} = \frac{(5 \times C_{\text{permanganate de potassium}} \times V_{\text{permanganate de potassium insérée}})}{(2 \times V_{\text{solution à titrer}})} \times \text{dilution}$$

$$C_{\text{massique}} = C_{\text{molaire}} \times M_{H_2O_2}$$

$$\%_{H_2O_2} = (C_{\text{massique}} / d_{H_2O_2}) \times 100$$

Le pourcentage de la bouteille neuve de peroxyde d'hydrogène utilisée pour faire les solutions liquides stockées a été titré à 30%.

Pour la solution contenant de l'hypochlorite de sodium, la titration est réalisée à partir d'une pipette contenant du thiosulfate de sodium de concentration à 0,1 mol/L. Cette pipette est placée au-dessus d'une fiole contenant 10 mL de la solution NaOCl diluée $1/50^{\text{ième}}$, 1 g d'iodure de potassium, 5 ml d'acide acétique et 100 mL d'eau distillée. Le mélange est laissé

2 minutes avant d'ajouter goutte à goutte le thiosulfate de sodium. La titration est finie quand la solution à titrer devient translucide. Avec le volume de thiosulfate de sodium inséré pour que la solution devienne transparente, il est possible de calculer le pourcentage de chlore actif grâce à la formule suivante :

$$C_{\text{molaire en chlore actif}} = \frac{(V \text{ thiosulfate de sodium insérée})}{(V \text{ solution à titrer})} \times \text{dilution} \times \frac{1}{2} \times C_{\text{thiosulfate de sodium}}$$

$$C_{\text{massique en chlore actif}} = C_{\text{molaire en chlore actif}} \times M_{\text{NaOCl}}$$

$$\%_{\text{NaOCl}} = (C_{\text{massique en chlore actif}} / d_{\text{NaOCl}}) \times 100$$

- Efficacité de décontamination après stockage à différentes températures
 - Etude de l'effet d'un stockage de 14 semaines sur des solutions moussantes stockées à 4°C :

La solution moussante contenant H₂O₂ permet la génération d'une mousse stable même après 14 semaines de stockage à 4°C (4,1% de fraction liquide). Cette mousse est identique à celle formée avec une solution liquide fraîchement mélangée (4,3% de fraction liquide). De plus, elles permettent la décontamination de l'ensemble des matériaux jusqu'à 14 semaines (Figure 1).

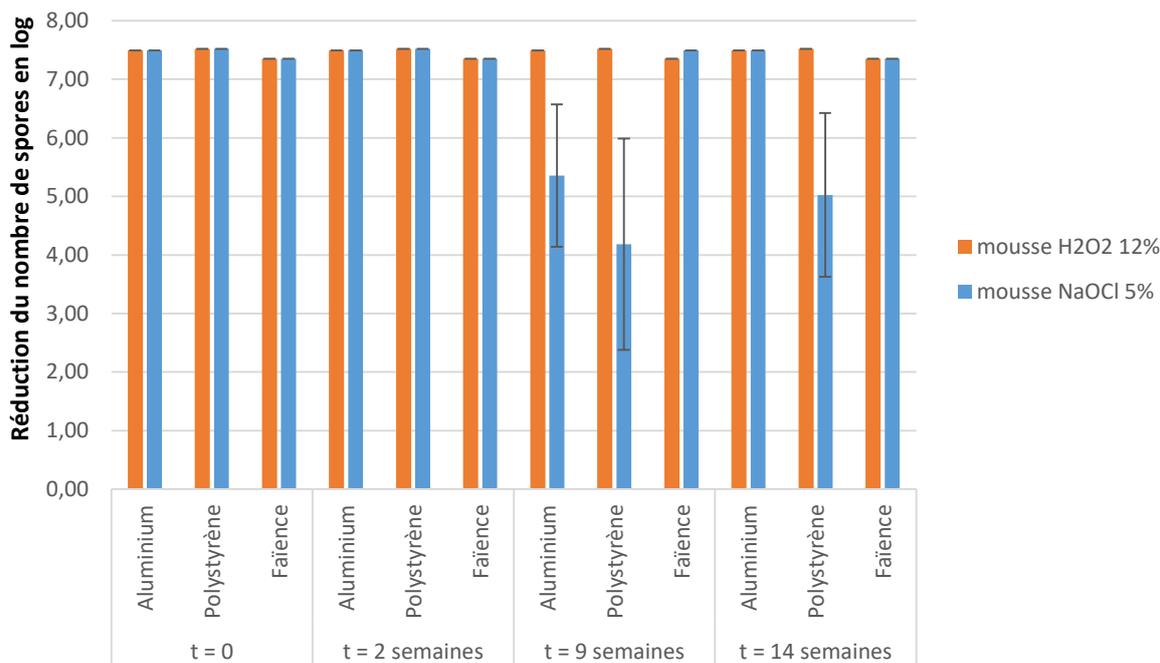


Figure 1. Evaluation de l'efficacité de décontamination sur trois matériaux en 30 minutes de temps de contact des mousses produites à partir de solutions liquides H₂O₂ 12% et NaOCl 5% stockées à 4°C pendant 14 semaines

La mousse NaOCl formée par une solution liquide stockée à 4°C permet la décontamination de l'ensemble des matériaux jusqu'à 9 semaines. A 9 semaines la réduction du nombre de spores est de $5,36 \pm 1,22$ log sur l'aluminium, $4,18 \pm 1,80$ log sur le polystyrène et plus de $7,49 \pm 0,00$ log sur la faïence. A 14 semaines la décontamination se fait totalement par ces mousses sur les supports en aluminium et la faïence mais de $5,03 \pm 1,40$ log sur le polystyrène. Nous avons constaté que les mousses générées au fur et à mesure du stockage deviennent de plus en plus sèches aboutissant à des mousses très sèches et cassantes au bout des 14 semaines (3,15% de fraction liquide).

En conclusion, après 14 semaines de stockage à 4°C, la décontamination des matériaux par la mousse H₂O₂ est supérieure à 7 logs et celle avec NaOCl d'environ 5 logs de spores en 30 minutes de contact. De plus, la titration des désinfectants a permis de mettre en évidence que les concentrations en NaOCl et H₂O₂ dans les solutions sont stables jusqu'à 14 semaines à 4°C. Ainsi, le stockage des solutions liquides dans une chambre froide permet la conservation du désinfectant dont la concentration n'est pas altérée après 14 semaines. La variation d'efficacité de la mousse NaOCl au cours du temps est corrélée avec la baisse de sa fraction liquide. Ainsi la mousse étant plus sèche, elle contient moins de désinfectant qu'une mousse

humide. La concentration en NaOCl devient alors trop faible pour permettre la décontamination totale des matériaux. A l’opposé, les mousses H₂O₂ et neutre ne présentent pas cette diminution de fraction liquide. Ainsi, le désinfectant NaOCl a une influence sur la stabilité dans le temps des additifs dans la solution liquide.

➤ Etude de l’effet d’un stockage de 14 semaines sur des solutions moussantes stockées à température ambiante :

A température ambiante les mousses H₂O₂ générées sont de plus en plus sèches, atteignant 2,85% de fraction liquide après 14 semaines de stockage. A 2 semaines ces mousses sont identiques aux mousses fraîches mais deviennent sèches et cassantes après 9 semaines (3,4% de fraction liquide). Elles permettent la décontamination de l’ensemble des matériaux jusqu’à 14 semaines sauf pour le support en aluminium qui est partiellement décontaminé après 14 semaines de stockage de la solution moussante à température ambiante (réduction en spores de $4,45 \pm 1,67$ log) (Figure 2).

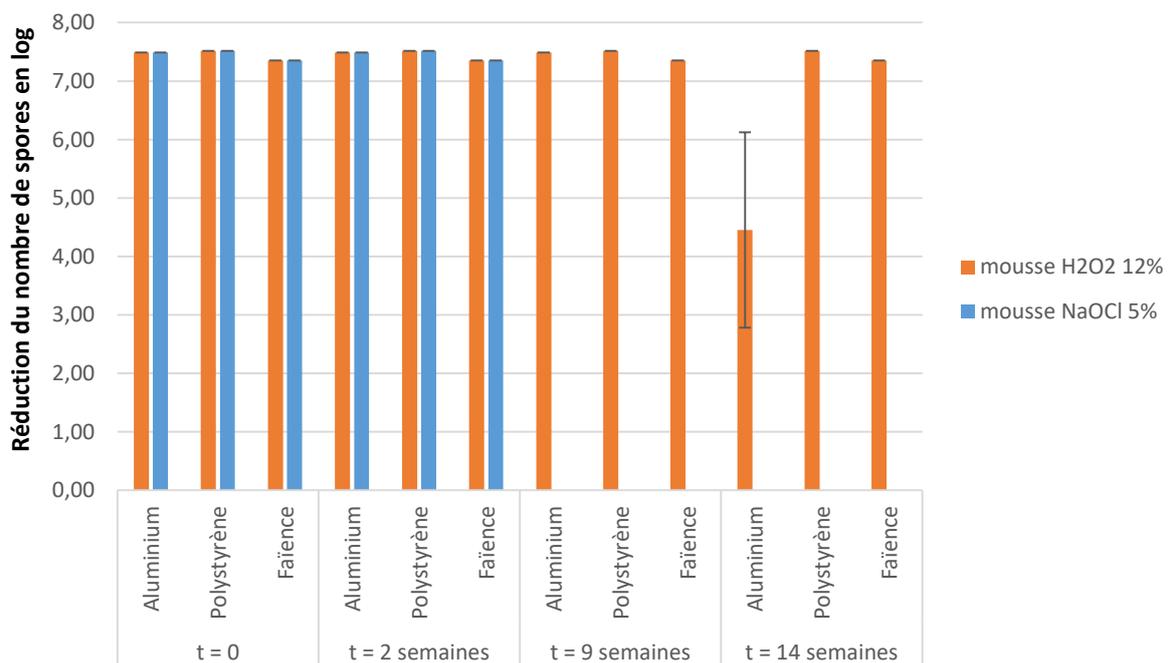


Figure 2. Evaluation de l’efficacité de décontamination sur trois matériaux en 30 minutes de temps de contact des mousses produites à partir de solutions liquides H₂O₂ 12% et NaOCl 5% stockées à température ambiante pendant 14 semaines

Les solutions moussantes NaOCl stockées à température ambiante entraînent la décontamination de l’ensemble des matériaux jusqu’à 2 semaines de stockage. Cette mousse

NaOCl générée après deux semaines de stockage est de 4,5% de fraction liquide mais retourne vite à l'état liquide. Après ce laps de temps, les solutions moussantes ne permettant plus la génération de mousse et ne présentant plus de chlore actif lors des titrations, les essais n'ont pas été menés au-delà des deux semaines. L'utilisation de solutions moussantes neutres met en évidence un assèchement des mousses seulement après 14 semaines de stockage en absence de désinfectant (4,8% de fraction liquide). Avant ce laps de temps elle est la même que pour une solution liquide fraîche (5,3% de fraction liquide).

Ainsi, il est possible que le Xanthane se dégrade au fur et à mesure du stockage entraînant la formation de mousses plus sèches. Nous supposons qu'après 14 semaines de stockage, la dégradation du Xanthane dans les solutions moussantes entraîne la formation de mousses plus sèches. Les mousses H₂O₂ atteignent alors une concentration limite pour assurer la décontamination de 7 logs de spores sur l'ensemble des matériaux. Des essais avec des mousses neutres après stockage à cette température mettent en évidence que la présence de H₂O₂ dans la solution n'impacte pas cette dégradation. En effet, la diminution de la fraction liquide des mousses neutre et H₂O₂ est la même au cours du temps. Les résultats avec la solution liquide NaOCl sont différents de ceux avec H₂O₂. Après 9 semaines à température ambiante, la solution moussante ne permet pas de générer de la mousse NaOCl. Le Xanthane n'est donc pas le seul additif à être dégradé lors du stockage à cette température. La solution étant incapable de mousser, il est fort probable que le GlucoPON[®] ait été totalement dégradé lors du stockage. En plus de cet additif, le stockage altère la concentration en NaOCl. En effet, le désinfectant NaOCl n'est plus mesurable après 9 semaines de stockage à température ambiante. Sa disparition se fait donc entre 2 et 9 semaines de stockage.

➤ Etude de l'effet d'un stockage de 14 semaines sur des solutions moussantes stockées à 40°C :

Les mousses générées après 14 semaines de stockage à 40°C sont plus humides et retournent vite à l'état liquide (fraction liquide de 11%). Ce retour à l'état liquide est observé dès 9 semaines mais avant ce laps de temps la mousse formée semble la même que fraîchement produite. Elles permettent cependant la décontamination de l'ensemble des supports même après 14 semaines à 40°C (Figure 3).

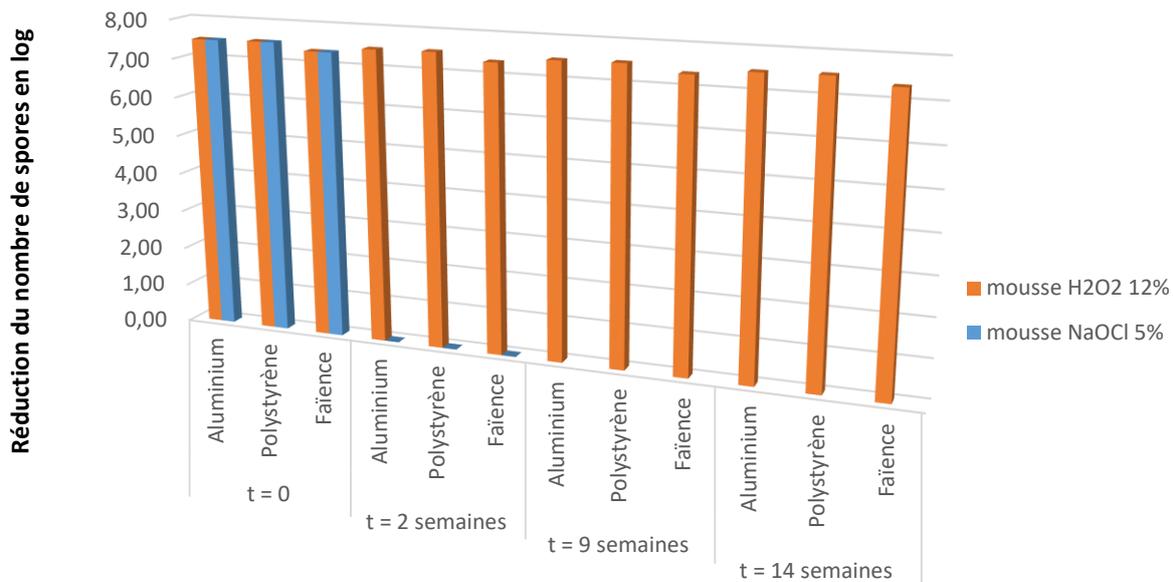


Figure 3. Evaluation de l'efficacité de décontamination sur trois matériaux en 30 minutes de temps de contact des mousses produites à partir de solutions liquides H₂O₂ 12% et NaOCl 5% stockées à 40°C pendant 14 semaines

A 40°C, la solution moussante NaOCl ne permet plus de générer de la mousse dès deux semaines de stockage. Les essais réalisés avec la solution moussante NaOCl après deux semaines de stockage à 40°C ne montrent pas de réduction du nombre de spores sur les supports (nombre de spores récupérées supérieur à 7 logs pour les trois matériaux). Ces résultats sont cohérents avec ceux de la titration en chlore actif. En effet, dès 2 semaines de stockage, NaOCl n'est plus titré dans la solution moussante indiquant que le désinfectant s'est entièrement dégradé. Ainsi, la disparition du NaOCl est encore plus rapide dans les solutions liquides stockées à 40°C qu'à température ambiante. L'absence de désinfectant explique l'inefficacité de décontamination des mousses générées à partir de cette solution liquide. La solution H₂O₂ stockée 14 semaines à 40°C permet encore la décontamination de l'ensemble des matériaux en 30 minutes. Cependant, la mousse générée est très humide presque liquide. Cela laisse supposer qu'une grande partie du Glucopton® ait été détériorée après 14 semaines de stockage à 40°C.

En conclusion, un stockage des solutions liquides prêtes à l'emploi à 4°C permet la conservation de l'ensemble des propriétés de la solution H₂O₂. A cette température, il existe une détérioration du Xanthane au cours du temps dans la solution liquide NaOCl. Ces résultats

reliés à ceux à température ambiante pour les mousses H₂O₂ et neutre, montrent une dégradation naturelle du Glucocon® et du Xanthane au cours du temps. En présence de NaOCl cette dégradation est accélérée. Il est donc possible qu'en plus de leur dégradation naturelle, NaOCl détruit une partie de ces deux additifs. Cette destruction rend donc impossible la génération de mousse NaOCl après un temps de stockage de quelques semaines à température ambiante. De fait, l'utilisation d'une solution prête à l'emploi contenant l'ensemble des produits est difficilement envisageable avec NaOCl. Cette conclusion est appuyée par la disparition totale de ce désinfectant en quelques jours à 40°C. Il peut donc être envisagé un stockage séparé entre le désinfectant NaOCl et les additifs. En effet, les solutions neutres permettent encore la génération de mousses après 14 semaines de stockage. Le stockage du Glucocon® et du Xanthane dans une même solution peut donc être envisagé. Cependant, comme nous l'indique les résultats avec les solutions liquides H₂O₂ et neutre, le stockage doit se faire en frigo ou chambre froide à 4°C afin d'éviter la dégradation des additifs.

Annexe 3

Evaluation des performances de décontamination des mousses suivant les normes EN 13697 : 2001 et EN 13704.

Les mousses doivent permettre la décontamination d'infrastructure en cas d'attentat ou d'accident biologique. Cependant, la question s'est posée de son utilisation dans les domaines agroalimentaire et hospitalier. Afin de déterminer si les mousses sont adaptées à une utilisation dans ces deux milieux, nous avons réalisés des essais d'effet biocide suivant les normes AFNOR EN 13697 : 2001 et EN 13704 relatives à ces domaines. Ces essais sont séparés en deux parties : une partie regroupant l'ensemble des contrôles à réaliser pour valider l'essai et une partie caractérisant l'efficacité biocide de la mousse.

- Matériels utilisés pour ces essais :

Trois souches ont été utilisées pour les essais selon la norme EN 13697 : 2001. Elles sont : *Salmonella enterica typhimurium* (St) ATCC 13 311 (Public Health England, Salisbury, England) Gram négatif et Catalase positif, *Enterococcus hirae* (Eh) ATCC 10 541 (Public Health England, Salisbury, England) Gram positif et Catalase négatif et *Staphylococcus aureus* (Sa) ATCC 6538 (Public Health England, Salisbury, England) Gram positif et Catalase positif.

Les essais ont été réalisés sur des disques en acier inoxydable (type 1.4301) pour répondre aux exigences de la norme EN 10088-1 de 2 cm de diamètre et de nuance 2 B (M.G.S., Orsan, France). Ces supports ont été stérilisés en passant une nuit dans un bain de peroxyde d'hydrogène (ANIOS Co., Lille-Hellemmes, France), puis nettoyés avec de l'éthanol 70%, avant une utilisation immédiate.

- Méthodes de culture des bactéries végétatives :

Dans un premier temps, une culture est préparée à partir d'une suspension stockée au souchier à -80°C et avec 10 mL de TSB dans une fiole 100 mL. Après une incubation de 18h, la DO_{600nm} de la suspension est mesurée afin d'ajuster le nombre de bactéries à $1,5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ CFU/mL. Nous avons trouvé dans la littérature les valeurs équivalentes entre la DO_{600} d'une espèce bactérienne et sa concentration. Ainsi, 1 de DO_{600} est équivalent à $1,23 \times 10^9$ CFU/mL pour Eh et $1,26 \times 10^9$ CFU/mL pour St. Pour Sa, 0,2 de DO_{600} équivaut à $4,25 \times 10^9$ CFU/mL. La dilution des bactéries pour atteindre la concentration souhaitée est réalisée avec du TSB. Un dénombrement est réalisé à partir de cette suspension. Les comptages ont été faits à des

dilutions de 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} où 1 mL en duplicat de ces dilutions, ont été déposés dans des boîtes de Petri et recouvert avec 15 mL à 20 mL TSA à 45°C. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Les colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU. Les boîtes comptables sont remis à incuber 24h avant un nouveau comptage. Les résultats de ce comptage représentent la quantité de bactéries dans la suspension avant dépôt (N).

- Protocoles de contrôles et d'évaluations de l'efficacité de décontamination des mousses :

Il s'agit d'évaluer si les mousses peuvent répondre aux normes utilisées pour qualifier les désinfectants en terme de performance de décontamination dans les domaines de l'agro-alimentaire, l'industrie, du domestique et en collectivités. Des essais ont été réalisés sur un support en acier inoxydable avec les souches *Enterococcus hirae* (Eh), *Salmonella enterica typhimurium* (St) et *Staphylococcus aureus* (Sa) selon la norme EN 13697 : 2001, ainsi que des spores de Bt selon EN 13704. Ces essais sont divisés en deux parties. La première consiste à s'assurer de la bonne neutralisation des désinfectants par les solutions de neutralisation et que celles-ci n'ont pas d'impact sur les bactéries. Une deuxième partie réalisée en parallèle de la première est l'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses contenant le désinfectant ainsi que le contrôle du bon fonctionnement du protocole expérimental avec une mousse neutre.

➤ Contrôles de neutralisation :

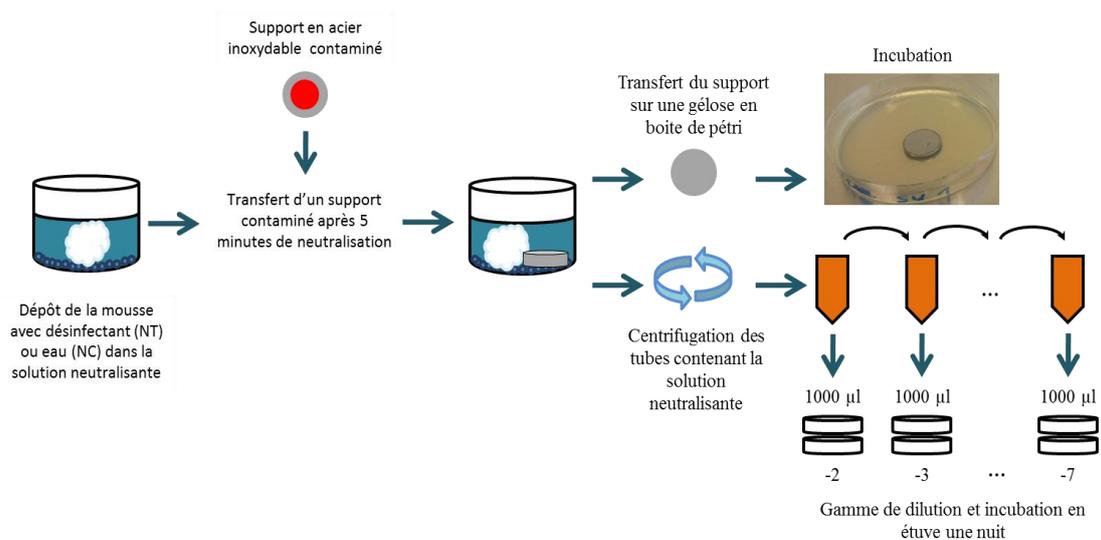


Figure 1. Schéma du protocole des contrôles de neutralisation selon les normes EN 13697 : 2001 et EN 13704

Pour réaliser les essais de contrôle de neutralisation, des supports en acier inoxydable sont contaminés avec 50 µL de la suspension bactérienne (Sa, Eh et St) à $1,5 \times 10^8$ - 5×10^8 CFU/mL et de Bt à $1,5$ - 5×10^6 CFU/mL (Figure 1). La contamination est laissée à sécher sous la hotte pendant 40 minutes. Pendant ce temps, 10 mL de la solution neutralisante de thiosulfate de sodium 10g/L ou de catalase 40 mg/L, sont placés dans un bécher en verre contenant 5 g de billes en verre. Ensuite, 10 mL de la mousse contenant les désinfectants sont ajoutés par injection avec une pipette dans la solution neutralisante correspondante. Après 5 minutes d'attente pour que la solution neutralisante désactive le désinfectant, les supports contaminés sont transférés dans les bécjers face contaminée contre les billes en verre. Immédiatement après, les bécjers sont passés au vortex pendant 1 minute à 150 rpm. Une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-4} est réalisée avec du TSB. Puis 1 mL de chaque dilution est déposé en duplicat dans des boîtes de Petri et recouvert 15 mL à 20 mL de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C. Le support est rincé avec 10 mL d'eau distillée stérile, puis déposé sur une gélose de TSA déjà coulée dans une boîte puis il est recouvert par une nouvelle couche de gélose. Les boîtes sont ensuite placées retournées en étuve à 37°C pour les bactéries végétatives et 30°C pour les spores, pendant 24-36h. Les colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU.

➤ Evaluation de l'efficacité de décontamination des mousses selon les normes norme EN 13697 : 2001 et NF EN 13704 :

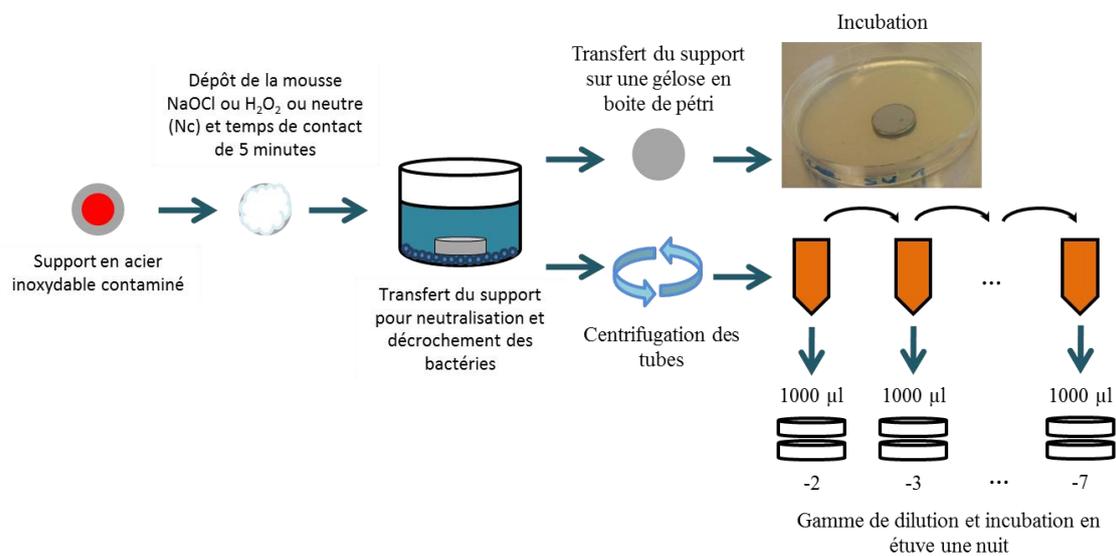


Figure 2. Schéma du protocole d'évaluation de l'efficacité de décontamination des mousses selon les normes EN 13697 : 2001 et NF EN 13704

Pour réaliser ces essais d'efficacité de décontamination, des supports en acier inoxydable sont contaminés avec 50 µL de la suspension bactérienne à $1,5 \times 10^8$ - 5×10^8 CFU/mL et de Bt à $1,5 \times 10^6$ CFU/mL (Figure 2). La contamination est laissée à sécher sous la hotte pendant 40 minutes. Après séchage de la contamination, 10 mL Des mousses contenant soit NaOCl, soit H₂O₂ ou aucun des désinfectants (neutre) sont déposées sur le support contaminé. Le temps de contact entre les mousses et les bactéries est de 5 minutes. Suite à ce temps de contact, les supports traités avec la mousse sont transférés dans un bécher contenant 10 mL de la solution neutralisante de thiosulfate de sodium 10g/L ou de catalase 40 mg/L et 5 g de billes en verre. Immédiatement après, les béchers sont passés au vortex pendant 1 minute à 150 rpm et laissés 5 minutes pour neutralisation du désinfectant. Une série de dilution (10^{-1} à 10^{-5}) est réalisée avec du TSB. Puis 1 mL de chaque dilution est déposé en duplicat dans des boîtes de Petri et recouvert par 15 mL à 20 ml de gélose TSA en surfusion refroidie à 45°C. Le support est rincé avec 10 mL d'eau distillée stérile, puis déposé sur une gélose de TSA déjà coulée dans une boîte puis il est recouvert par une nouvelle couche de gélose. Les boîtes sont ensuite placées retournées en étuve à 37°C pour les bactéries végétatives et 30°C pour les spores, pendant 24-36h. Les colonies de bactéries formées au sein de la gélose sont dénombrées manuellement selon une plage de comptage de 30-300 CFU.

- Validation du protocole expérimental par les contrôles de récupération :

Le premier de ces contrôles est la mesure de la quantité de bactéries dans la suspension avant dépôt (N). Dans notre étude les contrôles N réalisés lors de chaque essai sont en moyenne de $2,3 \times 10^6$ spores et de $3,4 \times 10^8$ bactéries végétatives. Ces résultats indiquent que la quantité de bactéries déposée pour chaque essai est conforme à celle imposée par la norme (entre $1,5 \times 10^6$ et 5×10^6 CFU/mL pour les spores et entre $1,5 \times 10^8$ et 5×10^8 CFU/mL pour les bactéries végétatives).

Deux autres contrôles sont réalisés afin de déterminer l'impact du neutralisant sur la réduction de bactéries (NC et NT). Ces essais sont réalisés avec la catalase, le neutralisant de l' H_2O_2 et le thiosulfate de sodium, celui de NaOCl. Ils permettent de valider l'arrêt de l'action du biocide par les neutralisants (NT) et de s'assurer qu'ils n'interagissent pas avec les spores (NC). La différence entre ces deux contrôles doit être la plus faible possible ($\pm 0,3$ log) afin de valider la bonne utilisation des neutralisants. La Figure 3 montre les résultats de ces deux contrôles suivant les différentes souches de bactéries.

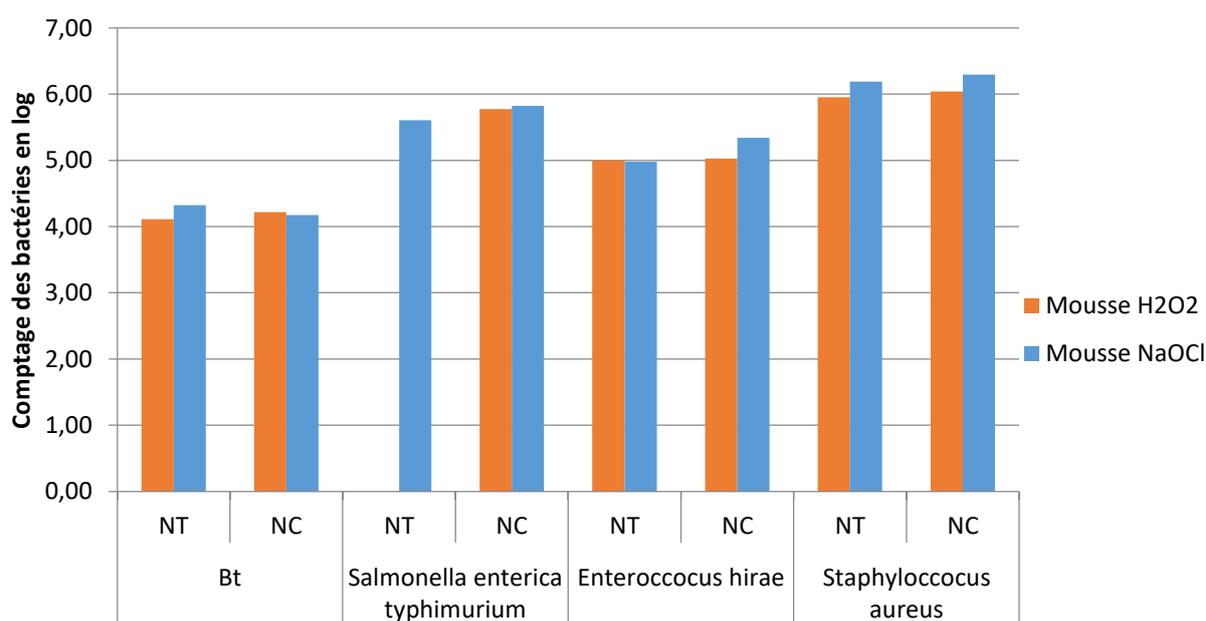


Figure 3. Résultats des contrôles NT et NC pour les mousses H_2O_2 et NaOCl pour chaque contaminant et après 5 minutes de contact entre la mousse et le neutralisant.

Les résultats des contrôles NT étant identiques à ceux de NC, il est possible de valider l'efficacité des solutions neutralisantes dans l'inactivation des biocides présents dans la

mousse. La catalase et le thiosulfate de sodium permettent d'inactiver respectivement le peroxyde d'hydrogène et l'hypochlorite de sodium en seulement 5 minutes de contact.

Enfin le dernier contrôle est celui réalisé avec une mousse Neutre(Nc) (Figure 4).

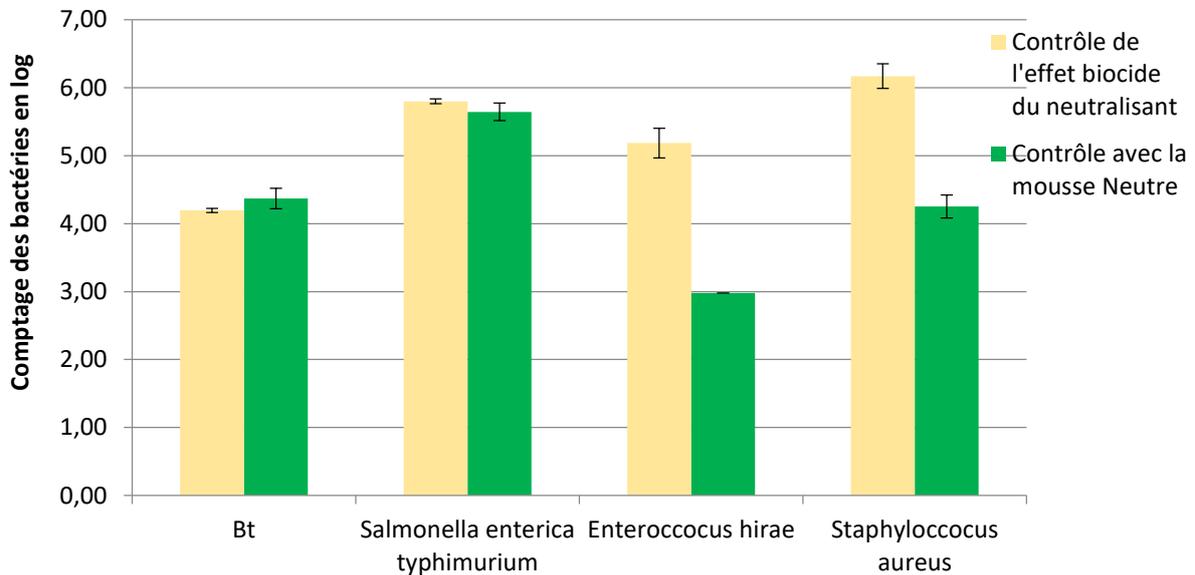


Figure 4. Comparaison de la moyenne des contrôles de l'effet biocide du neutralisant (NC) avec les résultats des essais avec la mousse Neutre (Nc) chaque contaminant.

Les résultats de récupération suite aux essais avec une mousse neutre sont de $4,37 \pm 0,15$ log pour les spores de *Bt*, $5,64 \pm 0,13$ log pour les bactéries de *Salmonella enterica typhimurium* (St), $2,98 \pm 0,00$ log pour *Enterococcus hirae* (Eh) et $4,25 \pm 0,17$ log pour *Staphylococcus aureus* (Sa). Le nombre de bactéries récupéré après traitement avec une mousse neutre (Nc) est plus bas que pour les contrôles NC et NT pour les souches Eh et Sa. Cette différence de récupération est peut-être due à la différence qu'il y a entre les protocoles des contrôles Nc, NT et NC. Les calculs d'efficacité de décontamination des mousses H_2O_2 prenant en compte le Nc comme CFU_{neutre} (équation (1)), les valeurs de réduction du nombre de bactéries ne pourront dépasser 2,98 log pour Eh et 4,25 log pour Sa.

- Efficacité de décontamination des mousses biocides :

L'efficacité de décontamination des mousses NaOCl et H₂O₂ entraînent une décontamination totale des spores de Bt en 1 heure de temps de contact sur un support en acier inoxydable (4,37 ± 0,11 log de réduction) (Figure 5).

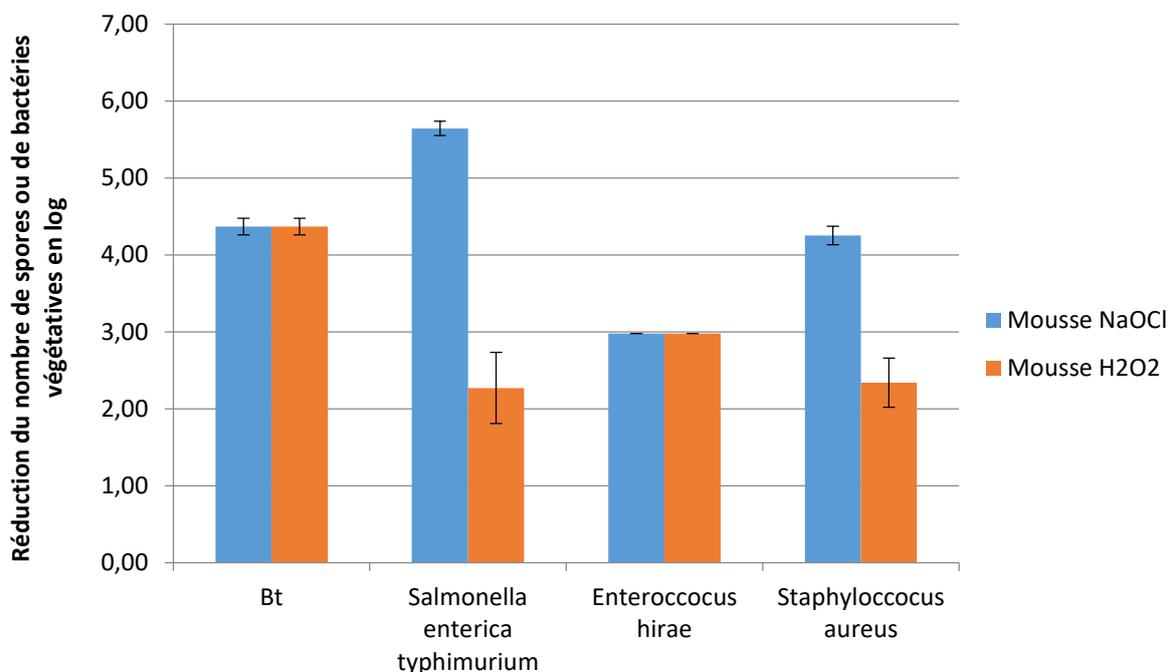


Figure 5. Efficacité de décontamination des mousses NaOCl et H₂O₂ sur les spores de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en 1 heure de contact et les bactéries *Salmonella enterica typhimurium* (St), *Enterococcus hirae* (Eh) et *Staphylococcus aureus* (Sa) en 5 minutes de contact suivant le protocole des normes européennes EN 13697 : 2001 et EN 13704

Selon la norme EN 13704, le désinfectant testé doit permettre la réduction d'au moins 3 logs de spores en 1 heure de contact. Les mousses NaOCl et H₂O₂ dépassent ces exigences en permettant la décontamination de plus de 4 logs durant ce temps de contact. Ces essais permettent donc de valider que les mousses NaOCl et H₂O₂ permettent d'atteindre les exigences de la norme EN 13704 relative à une contamination en spores.

Les essais réalisés en présence des bactéries végétatives indiquent que la mousse NaOCl permet de décontaminer l'ensemble des supports en cinq minutes. Ainsi, la réduction du nombre de bactéries par la mousse NaOCl est calculée à 2,98 ± 0,00 log en présence d'Eh, 5,64 ± 0,09 log pour Sa et 4,25 ± 0,12 log avec St. L'exigence de la norme EN 13697 : 2001, est d'obtenir la réduction d'au moins 4 logs de bactéries végétatives en 5 minutes de contact avec

le biocide. La faible récupération lors des essais avec les mousses neutres (Nc) pour les bactéries Eh, limite la valeur maximum d'efficacité de décontamination pouvant être atteinte avec cette souche. Cependant, il est donc probable que la décontamination pour la mousse NaOCl de cette bactérie, dépasse les 4 logs requis. Ces essais permettent donc de valider l'efficacité de décontamination de la mousse NaOCl 5% sur d'autres bactéries que les spores de Bt. La mousse NaOCl montre ainsi une nouvelle fois sa polyvalence.

La mousse H₂O₂ par contre, ne permet qu'une diminution partielle des bactéries durant ce même laps de temps. Elle entraîne une diminution de $2,27 \pm 0,46$ logs pour les bactéries de Sa et de $2,34 \pm 0,32$ logs avec St. Cependant, la décontamination des supports contaminés avec la souche Eh est totale. La mousse H₂O₂ montre ainsi des résultats différents suivant l'espèce bactérienne avec laquelle elle est mise en contact. La caractéristique commune des espèces bactériennes St et Sa est leur capacité à produire dans leur environnement de la catalase. Or, c'est ce même composé qui est utilisé dans notre étude comme agent neutralisant de l'action du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, la catalase excrétée par les bactéries St et Sa réagit avec une grande partie du peroxyde d'hydrogène contenu dans la mousse. La concentration en H₂O₂ diminuant en présence de ce neutralisant, la quantité de biocide n'est donc plus suffisante pour décontaminer entièrement les bactéries (*El-Azizi, Farag et al., 2016*). Cette hypothèse est renforcée par les résultats d'efficacité de décontamination de cette mousse sur les bactéries Eh. Les bactéries Eh sont considérées comme catalase négative. Ces bactéries ne produisant pas de catalase, la concentration en peroxyde d'hydrogène au sein de la mousse ne varie pas. La décontamination des supports contaminés Eh se fait donc entièrement par la mousse H₂O₂. Ainsi, l'augmentation de la concentration en H₂O₂ permettrait certainement un apport en biocide suffisant pour décontaminer les bactéries en présence de catalase. De plus, selon la norme, l'action du biocide avec la contamination doit être de seulement 5 minutes. Il est alors possible qu'un allongement de ce temps de contact permette de meilleurs résultats d'efficacité de décontamination de la mousse d'H₂O₂. Ces essais ont permis de démontrer la mousse H₂O₂ 12% ne semble pas appropriée pour la décontamination des bactéries végétatives productrices de catalase dans ces conditions d'utilisation.

Enfin, il est possible que le protocole expérimental de ces normes ne soit pas adapté pour les désinfectants sous forme de mousse. En effet, les normes ont été rédigées pour des

produits biocides liquides. Ils ont dû être adaptés pour que nous puissions réaliser les essais sur les mousses le plus fidèlement aux normes. Au moment de ces essais aucune norme spécifique aux mousses biocides n'existe. Il peut être envisagé de refaire les essais si une norme spécifique à l'utilisation de biocides sous forme de mousse est publiée au Journal Officiel.

En conclusion, la mousse NaOCl permet de décontaminer très rapidement (5 minutes) la totalité des bactéries végétatives présentes sur les supports et ce pour les trois espèces bactériennes utilisées dans lors de ces essais. A l'inverse la mousse H₂O₂ n'a permis de décontaminer entièrement que les supports présentant les bactéries *Enterococcus hirae*. Ces bactéries sont les seules de cette étude à ne pas produire de catalase. Il est donc probable que la catalase sécrétée par les bactéries *Salmonella enterica typhimurium* et *Staphylococcus aureus* soit en quantité suffisante pour inactiver une partie du peroxyde d'hydrogène présent dans le film de mouillage et diminuer l'efficacité de décontamination de cette mousse. Les normes sur les bactéries végétatives stipulent un temps de contact de 5 minutes. Il est alors possible qu'une augmentation de ce temps de contact ou de la concentration en H₂O₂ puisse améliorer l'efficacité de décontamination de cette mousse sur ces bactéries catalase positive.

Références

Références

- Abidi, S. H., S. K. Sherwani, T. R. Siddiqui, A. Bashir and S. U. Kazmi (2013). "Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan." *Bmc Ophthalmology*. 13.
- Abu Khweek, A. and A. O. Amer (2018). "Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*." *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8.
- Alargova, R. G., D. S. Warhadpande, V. N. Paunov and O. D. Velev (2004). "Foam superstabilization by polymer microrods." *Langmuir* 20(24): 10371-10374.
- Almatroudi, A., I. B. Gosbell, H. Hu, S. O. Jensen, B. A. Espedido, S. Tahir, T. O. Glasbey, P. Legge, G. Whiteley, A. Deva and K. Vickery (2016). "*Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control." *J. Hosp. Infect.* 93(3): 263-270.
- Amoako, K. K., K. Santiago-Mateo, M. J. Shields and E. Rohonczy (2013). "*Bacillus anthracis* Spore Decontamination in Food Grease." *J. Food Prot.* 76(4): 699-701.
- An, Y. H. and R. J. Friedman (1997). "Laboratory methods for studies of bacterial adhesion." *J. Microbiol. Meth.* 30: 141–152.
- Andersen, B. M., M. Rasch, K. Hochlin, F. H. Jensen, P. Wismar and J. E. Fredriksen (2006). "Decontamination of rooms, medical equipment and ambulances using an aerosol of hydrogen peroxide disinfectant." *J. Hosp. Infect.* 62(2): 149-155.
- Aronson, A. I. and P. Fitz-James (1976). "Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat." *Bacteriol. Rev.* 40(2): 360-402.
- Asnacios, A., V. Bergeron, D. Langevin and J. F. Argillier (1997). "Anionic polyelectrolyte cationic surfactant interactions in aqueous solutions and foam films stability." *Rev Institut Francais du Petrole* 52(2): 139-&.
- Atrih, A., P. Zollner, G. Allmaier, M. P. Williamson and S. J. Foster (1998). "Peptidoglycan structural dynamics during germination of *Bacillus subtilis* 168 endospores." *J. Bacteriol.* 180(17): 4603-4612.
- Azimi, N., A. H. Hassani, G. N. Darzi and S. M. Borghei (2017). "Biodegradation of Wastewater Containing High Concentration of Sulfamethoxazole by Antibiotic Adopted Biofilm in Attached Growth Bioreactor." *Pol. J. Environ. Stud.* 26(6): 2463-2469.
- Baier, R. E. (1970). "Chapter 2 - Surface Properties Influencing Biological Adhesion A2 - Manly, Richard S". *Adhesion in Biological Systems*, Academic Press: 15-48.
- Barbut, F., D. Menuet, M. Verachten and E. Girou (2009). "Comparison of the Efficacy of a Hydrogen Peroxide Dry-Mist Disinfection System and Sodium Hypochlorite Solution for Eradication of *Clostridium difficile* Spores." *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 30(6): 507-514.
- Barigou, M. and J. F. Davidson (1994). "Soap Film Drainage - Theory and Experiment." *Chem. Eng. Sci.* 49(11): 1807-1819.
- Bath, J., L. J. Wu, J. Errington and J. C. Wang (2000). "Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum." *Science* 290(5493): 995-997.
- Beaman, T. C. and P. Gerhardt (1986). "Heat-Resistance of Bacterial-Spores Correlated with Protoplast Dehydration, Mineralization, and Thermal Adaptation." *Appl. Environ. Microbiol.* 52(6): 1242-1246.
- Bergeron, V. (1997). "Disjoining pressures and film stability of alkyltrimethylammonium bromide foam films." *Langmuir* 13(13): 3474-3482.

- Bhakta, A. and E. Ruckenstein (1996). "Modeling of the generation and collapse of aqueous foams." *Langmuir* 12(12): 3089-3099.
- Bjarnsholt, T. (2013). "The role of bacterial biofilms in chronic infections." *APMIS Suppl.* (136): 1-51.
- Bloomfield, S. F. and E. E. Uso (1985). "The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants." *J. Hosp. Infect.* 6(1): 20-30.
- Bottone, E. J. (2010). "Bacillus cereus, a volatile human pathogen." *Clin. Microbiol. Rev.* 23(2): 382-398.
- Bouffartigues, E., R. Duchesne, A. Bazire, M. Simon, O. Maillot, A. Dufour, M. Feuilloley, N. Orange and S. Chevalier (2014). "Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX." *FEMS Microbiol. Lett.* 356(2): 193-200.
- Boulangepetermann, L., B. Baroux and M. N. Bellonfontaine (1993). "The Influence of Metallic Surface Wettability on Bacterial Adhesion." *J. Adh. Sci. Tech.* 7(3): 221-230.
- Bower, C. K. and M. A. Daeschel (1999). "Resistance responses of microorganisms in food environments." *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2): 33-44.
- Briandet, R., Fechner, L., Naïtali, M., Dreanno, C. (2012). " Biofilms, quand les microbes s'organisent " Ed. Quae.
- Briandet, R., P. Lacroix-Gueu, M. Renault, S. Lecart, T. Meylheuc, E. Bidnenko, K. Steenkeste, M. N. Bellon-Fontaine and M. P. Fontaine-Aupart (2008). "Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms." *Appl. Environ. Microbiol.* 74(7): 2135-2143.
- Bridier, A., R. Briandet, V. Thomas and F. Dubois-Brissonnet (2011). "Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review." *Biofouling* 27(9): 1017-1032.
- Brown, M. R. W. and P. Gilbert (1993). "Sensitivity of Biofilms to Antimicrobial Agents." *J. Appl. Bacteriol.* 74: S87-S97.
- Bruzaud, J., J. Tarrade, E. Celia, T. Darmanin, E. T. de Givenchy, F. Guittard, J. M. Herry, M. Guilbaud and M. N. Bellon-Fontaine (2017). "The design of superhydrophobic stainless steel surfaces by controlling nanostructures: A key parameter to reduce the implantation of pathogenic bacteria." *Mat. Sci. Engin. C-Mat. Biol. Appl.* 73: 40-47.
- Bruzaud, J., J. Tarrade, A. Coudreuse, A. Canette, J. M. Herry, E. T. de Givenchy, T. Darmanin, F. Guittard, M. Guilbaud and M. N. Bellon-Fontaine (2015). "Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 131: 59-66.
- Buchanan, C. E. and S. L. Neyman (1986). "Correlation of Penicillin-Binding Protein-Composition with Different Functions of 2 Membranes in *Bacillus-Subtilis* Forespores." *J. Bacteriol.* 165(2): 498-503.
- Buhr, T. L., A. A. Young, Z. A. Minter, C. M. Wells, D. C. McPherson, C. L. Hooban, C. A. Johnson, E. J. Prokop and J. R. Crigler (2012). "Test method development to evaluate hot, humid air decontamination of materials contaminated with *Bacillus anthracis* Delta Sterne and *B. thuringiensis* Al Hakam spores." *J. Appl. Microbiol.* 113(5): 1037-1051.
- Burkholder, W. F., I. Kurtser and A. D. Grossman (2001). "Replication initiation proteins regulate a developmental checkpoint in *Bacillus subtilis*." *Cell.* 104(2): 269-279.
- Bylund, J. E., M. A. Haines, P. J. Piggot and M. L. Higgins (1993). "Axial Filament Formation in *Bacillus subtilis* - Induction of Nucleoids of Increasing Length after Addition of Chloramphenicol to Exponential-Phase Cultures Approaching Stationary Phase." *J. Bacteriol.* 175(7): 1886-1890.

- Calfee, M. W. and M. Wendling (2012). "The effects of environmental conditions on persistence and inactivation of *Brucella suis* on building material surfaces." Lett. Appl. Microbiol. 54(6): 504-510.
- Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck and A. Buret (1999). "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms." J. Clin. Microbiol. 37(6): 1771-1776.
- Chattopadhyay, S. (2016). "Adhesion and Decontamination of Biological Contaminants in Drinking Water Distribution Systems." Exposure and Health 8(2): 199-210.
- Cochran, W. L., G. A. McFeters and P. S. Stewart (2000). "Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine." J. Appl. Microbiol. 88(1): 22-30.
- Coleman, W. H., C. De, Y. Q. Li, A. E. Cowan and P. Setlow (2007). "How moist heat kills spores of *Bacillus subtilis*." J. Bacteriol. 189(23): 8458-8466.
- Corcoran, M., D. Morris, N. De Lappe, J. O'Connor, P. Lalor, P. Dockery and M. Cormican (2014). "Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials." Appl. Environ. Microbiol. 80(4): 1507-1514.
- Cortezzo, D. E., K. Koziol-Dube, B. Setlow and P. Setlow (2004). "Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress." J. Appl. Microbiol. 97(4): 838-852.
- Cortezzo, D. E. and P. Setlow (2005). "Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals." J. Appl. Microbiol. 98(3): 606-617.
- Costerton, J. W. (1994). "Structure of Biofilms." Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems: 1-14.
- Costerton, J. W. (1999). "Introduction to biofilm." Int. J. Antimicrob. Agents 11: 217-221.
- Cowan, A. E., D. E. Koppel, B. Setlow and P. Setlow (2003). "A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: Implications for spore dormancy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(7): 4209-4214.
- Cowan, A. E., E. M. Olivastro, D. E. Koppel, C. A. Loshon, B. Setlow and P. Setlow (2004). "Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101(20): 7733-7738.
- Culha, O., H. Gunerhan, E. Biyik, O. Ekren and A. Hepbasli (2015). "Heat exchanger applications in wastewater source heat pumps for buildings: A key review." Energy and Buildings 104: 215-232.
- Dalton, H. M. and P. E. March (1998). "Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling." Curr. Opin. Biotechnol. 9(3): 252-255.
- Dame, U., C. Fritz, O. Pitois and S. Faure (2005). "Relations between physicochemical properties and instability of decontamination foams." Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 263(1-3): 210-218.
- Davies, D. (2003). "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." Nat. Rev. Drug Discov. 2(2): 114-122.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science 280(5361): 295-298.
- De Beer, D., R. Srinivasan and P. S. Stewart (1994). "Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection." Appl. Environ. Microbiol. 60(12): 4339-4344.

- de Beer, D., P. Stoodley and Z. Lewandowski (1994). "Liquid flow in heterogeneous biofilms." *Biotechnol. Bioeng.* 44(5): 636-641.
- De Kievit, T. R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown and B. H. Iglewski (2001). "Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns." *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4): 1865-1873.
- Denyer, S. P. and G. S. A. B. Stewart (1998). "Mechanisms of action of disinfectants." *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 41(3-4): 261-268.
- Deziel, E., Y. Comeau and R. Villemur (2001). "Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities." *J. Bacteriol.* 183(4): 1195-1204.
- Dong, X., E. McCoy, M. Zhang and L. Yang (2014). "Inhibitory effects of nisin-coated multi-walled carbon nanotube sheet on biofilm formation from *Bacillus anthracis* spores." *J. Environ. Sci. (China)* 26(12): 2526-2534.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 167-+.
- Doona, C. J., Feeherry, F. E., Kustin, K., Olinger, G. G., Setlow, P., Malkin, A. J., Leighton, T. (2015). "Fighting Ebola with novel spore decontamination technologies for the military." *Front. Microbiol.* 6: 663.
- Douki, T., B. Setlow and P. Setlow (2005). "Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of *Bacillus* species." *Photochem. Photobiol. Sci.* 4(8): 591-597.
- Doyle, R. J., F. Nadjathaiem and J. S. Singh (1984). "Hydrophobic Characteristics of *Bacillus* Spores." *Curr. Microbiol.* 10(6): 329-332.
- Driks, A. (1999). "Bacillus subtilis spore coat." *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* 63: 1-20.
- Driks, A. (2002). "Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat." *Trends Microbiol.* 10(6): 251-254.
- Driks, A. (2002). "Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*." *Cell. Mol. Life Sci.* 59(3): 389-391.
- Edmonds, J. M., J. P. Sabol and V. K. Rastogi (2014). "Decontamination efficacy of three commercial-off-the-shelf (COTS) sporicidal disinfectants on medium-sized panels contaminated with surrogate spores of *Bacillus anthracis*." *PLoS One* 9(6): e99827.
- Edwards, A. N., S. T. Karim, R. A. Pascual, L. M. Jowhar, S. E. Anderson and S. M. McBride (2016). "Chemical and Stress Resistances of *Clostridium difficile* Spores and Vegetative Cells." *Front. Microbiol.* 7.
- El-Azizi, M., N. Farag and N. Khardori (2016). "Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms." *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 60-71.
- Environmental Protection Agency (2010). *Biological Agent Decontamination Technology Testing.* EPA/600/R-10/087.
- Errington, J. (2003). "Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*." *Nat. Rev. Microbiol.* 1(2): 117-126.
- Eryilmaz, M., B. Kaskatepe, M. E. Kiymaci, H. B. Erol, D. Simsek and A. Gumustas (2016). "In vitro antimicrobial activity of three new generation disinfectants." *Trop. J. Pharm. Res.* 15(10): 2191-2195.
- Faille, C., C. Jullien, F. Fontaine, M. N. Bellon-Fontaine, C. Slomianny and T. Benezech (2002). "Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity." *Can. J. Microbiol.* 48(8): 728-738.

- Faure, S., B. Fournel and P. Fuentes (2002). Composition, foam and method for surface decontamination C. E. A. France. WO2004008463.
- Faure, S., E. Le Toquin and F. Gas (2016). Disinfecting aqueous foam, process for preparing same and use thereof. C. E. A. France, Google Patents. WO2016202879.
- Fauvart, M., V. N. De Groote and J. Michiels (2011). "Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies." *J. Med. Microbiol.* 60(Pt 6): 699-709.
- Fernandes, T., C. Bhavsar, S. Sawarkar and A. D'souza (2018). "Current and novel approaches for control of dental biofilm." *International Journal of Pharmaceutics* 536(1): 199-210.
- Flemming, H. C. and J. Wingender (2010). "The biofilm matrix." *Nat. Rev. Microbiol.* 8(9): 623-633.
- Flemming, H. C., J. Wingender, R. Moritz, W. Borchard and C. Mayer (1999). "Physico-chemical properties of biofilms - A short review." *Biofilms in the Aquatic Environment* (242): 1-12.
- Folsom, J. P., L. Richards, B. Pitts, F. Roe, G. D. Ehrlich, A. Parker, A. Mazurie and P. S. Stewart (2010). "Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis." *Bmc Microbiol.* 10.
- Fraser, G. M. and C. Hughes (1999). "Swarming motility." *Curr Opin Microbiol* 2(6): 630-635.
- Galie, S., C. Garcia-Gutierrez, E. M. Miguelez, C. J. Villar and F. Lombo (2018). "Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods." *Front. Microbiol.* 9.
- Garrett, T. R., M. Bhakoo and Z. Zhang (2008). "Bacterial adhesion and biofilms on surfaces." *Prog. Nat. Sci.* 18(9): 1049-1056.
- Gerhardt, P. and R. E. Marquis (1989). "Spore Thermoresistance Mechanisms." *Regulation of Prokaryotic Development*: 43-63.
- Ghafoor, A., I. D. Hay and B. H. Rehm (2011). "Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture." *Appl. Environ. Microbiol.* 77(15): 5238-5246.
- Ghanbari, A., J. Dehghany, T. Schwebs, M. Musken, S. Haussler and M. Meyer-Hermann (2016). "Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Sci. Rep.* 6: 32097.
- Ghosh, S., B. Setlow, P. G. Wahome, A. E. Cowan, M. Plomp, A. J. Malkin and P. Setlow (2008). "Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers." *J. Bacteriol.* 190(20): 6741-6748.
- Gilmore, M. E., D. Bandyopadhyay, A. M. Dean, S. D. Linnstaedt and D. L. Popham (2003). "Production of Muramic -Lactam in *Bacillus subtilis* Spore Peptidoglycan." *J. Bacteriol.* 186(1): 80-89.
- Gjermansen, M., P. Ragas, C. Sternberg, S. Molin and T. Tolker-Nielsen (2005). "Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms." *Environ. Microbiol.* 7(6): 894-906.
- Goel, A. K. (2015). "Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance." *World J. Clin. Cases* 3(1): 20-33.
- Gonzalez, E. A., P. Nandy, A. D. Lucas and V. M. Hitchins (2015). "Ability of cleaning-disinfecting wipes to remove bacteria from medical device surfaces." *Am. J. Infect. Control.* 43(12): 1331-1335.
- Grivet, M., J. J. Morrier, G. Benay and O. Barsotti (2000). "Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys." *J. Mater. Sci.-Mater. M.* 11(10): 637-642.

- Guan, J., M. Chan, B. W. Brooks and L. Rohonczy (2013). "Influence of temperature and organic load on chemical disinfection of *Geobacillus stearothermophilus* spores, a surrogate for *Bacillus anthracis*." *Can. J. Vet. Res.* 77: 100-104.
- Guignot, S. (2008). Rôle de particules colloïdales sur la stabilité de mousses de décontamination, Paris Est.
- Guignot, S. and S. Faure (2008). Decontamination, stripping and/or degreasing foam containing solid particles. C. E. A. France. WO2008101855.
- Guillermic, R.-M. (2011). Propriétés physico-chimiques des mousses: études approfondies sur des mousses modèles et études exploratoires sur de nouvelles mousses, Université Rennes 1.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton and P. Stoodley (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2): 95-108.
- Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley (2002). "Developmental regulation of microbial biofilms." *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(3): 228-233.
- Hamon, M. A. and B. A. Lazazzera (2001). "The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*." *Mol. Microbiol.* 42(5): 1199-1209.
- Hancock, R. E. W., R. Siehnel and N. Martin (1990). "Outer-Membrane Proteins of *Pseudomonas*." *Mol. Microbiol.* 4(7): 1069-1075.
- Hayes, C. S. and P. Setlow (2001). "An alpha/beta-type, small, acid-soluble spore protein which has very high affinity for DNA prevents outgrowth of *Bacillus subtilis* spores." *J. Bacteriol.* 183(8): 2662-2666.
- Heffron, J. D., E. A. Lambert, N. Sherry and D. L. Popham (2010). "Contributions of Four Cortex Lytic Enzymes to Germination of *Bacillus anthracis* Spores." *J. Bacteriol.* 192(3): 763-770.
- Heninger, S. J., C. A. Anderson, G. Beltz and A. B. Onderdonk (2009). "Decontamination of *Bacillus anthracis* Spores: Evaluation of Various Disinfectants." *Appl. Biosaf.* 14(1): 7-10.
- Henriques, A. O. and C. P. Moran, Jr. (2007). "Structure, assembly, and function of the spore surface layers." *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 555-588.
- Hilbert, D. W. and P. J. Piggot (2004). "Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2): 234-+.
- Hilgenfeldt, S., S. A. Koehler and H. A. Stone (2001). "Dynamics of coarsening foams: Accelerated and self-limiting drainage." *Phys. Rev. Lett.* 86(20): 4704-4707.
- Hilgren, J., K. M. J. Swanson, F. Diez-Gonzalez and B. Cords (2007). "Inactivation of *Bacillus anthracis* spores by liquid biocides in the presence of food residue." *Appl. Environ. Microbiol.* 73(20): 6370-6377.
- Humphreys, P. N. (2011). "Testing standards for sporicides." *J Hosp Infect* 77(3): 193-198.
- Ibrahim, M. A., N. Griko, M. Junker and L. A. Bulla (2010). "*Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective." *Bioeng. Bugs* 1(1): 31-50.
- INERIS (2012). "Règlement (UE) n° 528/2012 du 22/05/12 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides." http://www.ineris.fr/aida/consultation_document/183: [en ligne].
- Joshi, L. T., D. S. Phillips, C. F. Williams, A. Alyousef and L. Baillie (2012). "Contribution of spores to the ability of *Clostridium difficile* to adhere to surfaces." *Appl. Environ. Microbiol.* 78(21): 7671-7679.
- Jouenne, T. (2008). "Biofilms bactériens." *Techniques de l'ingénieur Bio* 600.

- Karatan, E. and P. Watnick (2009). "Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73(2): 310-+.
- Kennedy, M. J., S. L. Reader and L. M. Swierczynski (1994). "Preservation Records of Microorganisms - Evidence of the Tenacity of Life." *Microbiol.-Sgm* 140: 2513-2529.
- Khemiri, A., T. Jouenne and P. Cosette (2016). "Proteomics dedicated to biofilmology: What have we learned from a decade of research?" *Med. Microbiol. Immunol.* 205(1): 1-19.
- King, L.-A., M.-R. Popoff, C. Mazuet, E. Espié, V. Vaillant and H. de Valk (2010). "Le botulisme infantile en France, 1991–2009." *Archives de Pédiatrie* 17(9): 1288-1292.
- Kissinger, H. E. (1957). "Reaction kinetics in differential thermal analysis." *Analytical chemistry* 29(11): 1702-1706.
- Kjelleberg, S. (1984). *Adhesion to Inanimate Surfaces*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Klobutcher, L. A., K. Ragkousi and P. Setlow (2006). "The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*." *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103(1): 165-170.
- Knott, A. G., A. D. Russell and B. N. Dancer (1995). "Development of Resistance to Biocides during Sporulation of *Bacillus-Subtilis*." *J. Appl. Bacteriol.* 79(5): 492-498.
- Kong, L. B., P. F. Zhang, G. W. Wang, J. Yu, P. Setlow and Y. Q. Li (2011). "Characterization of bacterial spore germination using phase-contrast and fluorescence microscopy, Raman spectroscopy and optical tweezers." *Nat. Prot.* 6(5): 625-639.
- Kose, H. and N. Yapar (2017). "The comparison of various disinfectants' efficacy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers." *Turk. J. Med. Sci.* 47(4): 1287-1294.
- Kostakioti, M., M. Hadjifrangiskou and S. J. Hultgren (2013). "Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era." *Csh Perspect. Med.* 3(4).
- Laaberki, M. H. and J. Dworkin (2008). "Role of spore coat proteins in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to *Caenorhabditis elegans* predation." *J. Bacteriol.* 190(18): 6197-6203.
- Labas, M. D., C. S. Zalazar, R. J. Brandi and A. E. Cassano (2008). "Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide." *Biochem. Eng. J.* 38(1): 78-87.
- Langevin, D. (1998). "Dynamics of surfactant layers." *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 3(6): 600-607.
- Langevin, D. (2000). "Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties." *Advances in Colloid and Interface Science* 88(1-2): 209-222.
- Langevin, D. (2014). "Surface shear rheology of monolayers at the surface of water." *Adv. Colloid Interfac.* 207: 121-130.
- Lavkulich, L. M. and J. H. Wiens (1970). "Comparison of Organic Matter Destruction by Hydrogen Peroxide and Sodium Hypochlorite and Its Effects on Selected Mineral Constituents." *Soil Sci. Soc. Am. Pro.* 34(5): 755-+.
- Le Toquin, E., S. Faure, N. Orange and F. Gas (2018). "New biocide foam containing hydrogen peroxide for the decontamination of vertical surface contaminated with *Bacillus thuringiensis* spores." *Front. Microbiol.* 9(2295)
- Lee, J. S., Y. M. Bae, S. Y. Lee and S. Y. Lee (2015). "Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* on Various Surfaces and Their Resistance to Chlorine Sanitizer." *J. Food Sci.* 80(10): M2279-2286.

- Leggett, M. J., G. McDonnell, S. P. Denyer, P. Setlow and J. Y. Maillard (2012). "Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance." *J. Appl. Microbiol.* 113(3): 485-498.
- Leyva-Illades, J. F., B. Setlow, M. R. Sarker and P. Setlow (2007). "Effect of a small, acid-soluble spore protein from *Clostridium perfringens* on the resistance properties of *Bacillus subtilis* spores." *J. Bacteriol.* 189(21): 7927-7931.
- Linley, E., S. P. Denyer, G. McDonnell, C. Simons and J. Y. Maillard (2012). "Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action." *J. Antimicrob. Chemoth.* 67(7): 1589-1596.
- Madsen, J. S., S. J. Sorensen and M. Burmolle (2018). "Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties." *Curr. Opin. Microbiol.* 42: 104-109.
- Mah, J. H., D. H. Kang and J. Tang (2008). "Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*." *Int. J. Food Microbiol.* 128(2): 385-389.
- Mah, T. F., B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart and G. A. O'Toole (2003). "A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance." *Nature* 426(6964): 306-310.
- Malleck, T., G. Daufouy, S. Andre, V. Broussolle and S. Planchon (2018). "Temperature impacts the sporulation capacities and spore resistance of *Moorella thermoacetica*." *Food Microbiol.* 73: 334-341.
- Malysa, K. and K. Khristov (1994). "Direct and Electrical-Conductivity Measurements of the Liquid Contents in Steady-State Foams." *Colloid Surface A* 87(2): 125-132.
- March, J. K., M. N. Cohen, J. M. Lindsey, D. A. Millar, C. W. Lowe, A. J. Bunnell, K. L. O'Neill, G. B. Schaalje and R. A. Robison (2012). "The differential susceptibility of spores from virulent and attenuated *Bacillus anthracis* strains to aldehyde- and hypochlorite-based disinfectants." *Microbiologyopen* 1(4): 407-414.
- Marion, K., J. Freney, G. James, E. Bergeron, F. N. R. Renaud and J. W. Costerton (2006). "Using an efficient biofilm detaching agent: an essential step for the improvement of endoscope reprocessing protocols." *J. Hosp. Infect.* 64(2): 136-142.
- Marion, K., M. Pasmore, J. Freney, E. Delawari, F. Renaud, J. W. Costerton and J. Traeger (2005). "A new procedure allowing the complete removal and prevention of hemodialysis biofilms." *Blood Purification* 23(5): 339-348.
- Marques, S. C., J. D. O. S. Rezende, L. A. D. Alves, B. C. Silva, E. Alves, L. R. de Abreu and R. H. Piccoli (2007). "Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers." *Braz. J. Microbiol.* 38(3): 538-543.
- Marsh, P. D. (1994). "Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease." *Adv. Dent. Res.* 8(2): 263-271.
- Matz, L. L., T. C. Beaman and P. Gerhardt (1970). "Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*." *J. Bacteriol.* 101(1): 196-201.
- McBride, M. J. (2001). "Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces." *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 49-75.
- McClaine, J. W. and R. M. Ford (2002). "Characterizing the adhesion of motile and nonmotile *Escherichia coli* to a glass surface using a parallel-plate flow chamber." *Biotechnol. Bioeng.* 78(2): 179-189.
- McDonnell, G. and A. D. Russell (1999). "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance." *Clin. Microbiol. Rev.*: p. 147-179.

- Melly, E., A. E. Cowan and P. Setlow (2002). "Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide." *J. Appl. Microbiol.* 93(2): 316-325.
- Melly, E., P. C. Genest, M. E. Gilmore, S. Little, D. L. Popham, A. Driks and P. Setlow (2002). "Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures." *J. Appl. Microbiol.* 92(6): 1105-1115.
- Mikutta, R., M. Kleber, K. Kaiser and R. Jahn (2005). "Review: Organic matter removal from soils using hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, and disodium peroxodisulfate." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69(1): 120-135.
- Moats, W. A. (1971). "Kinetics of Thermal Death of Bacteria." *J. Bacteriol.* 105(1): 165-171.
- Moeller, R., M. Raguse, G. Reitz, R. Okayasu, Z. F. Li, S. Klein, P. Setlow and W. L. Nicholson (2014). "Resistance of *Bacillus subtilis* Spore DNA to Lethal Ionizing Radiation Damage Relies Primarily on Spore Core Components and DNA Repair, with Minor Effects of Oxygen Radical Detoxification." *Appl. Environ. Microbiol.* 80(1): 104-109.
- Moeller, R., P. Setlow, G. Horneck, T. Berger, G. Reitz, P. Rettberg, A. J. Doherty, R. Okayasu and W. L. Nicholson (2008). "Roles of the major, small, acid-soluble spore proteins and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from x rays and high-energy charged-particle bombardment." *J. Bacteriol.* 190(3): 1134-1140.
- Moeller, R., P. Setlow, G. Reitz and W. L. Nicholson (2009). "Roles of small, acid-soluble spore proteins and core water content in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to environmental solar UV radiation." *Appl. Environ. Microbiol.* 75(16): 5202-5208.
- Moir, A. (2006). "How do spores germinate?" *Journal of Applied Microbiology* 101(3): 526-530.
- Molle, V., M. Fujita, S. T. Jensen, P. Eichenberger, J. E. Gonzalez-Pastor, J. S. Liu and R. Losick (2003). "The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*." *Mol. Microbiol.* 50(5): 1683-1701.
- Monin, D., A. Espert and A. Colin (2000). "A new analysis of foam coalescence: From isolated films to three-dimensional foams." *Langmuir* 16(8): 3873-3883.
- Monk, I. R., G. M. Cook, B. C. Monk and P. J. Bremer (2004). "Morphotypic conversion in *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Biological significance of rough colony isolates." *Appl. Environ. Microbiol.* 70(11): 6686-6694.
- Murray, B. S. (2007). "Stabilization of bubbles and foams." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12(4-5): 232-241.
- Narchi, I. (2008). Etude du procédé de foisonnement en continu des milieux modèles : Interaction formulation-procédé sur les propriétés du produit fini. PhD, Université Blaise Pascal.
- Neethling, S. J., H. T. Lee and P. Grassia (2005). "The growth, drainage and breakdown of foams." *Colloid. Surface A* 263(1-3): 184-196.
- Nguyen Thi Minh, H., P. Dantigny, J. M. Perrier-Cornet and P. Gervais (2010). "Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure." *Biotechnol. Bioeng.* 107(5): 876-883.
- Nguyen Thi Minh, H., A. Durand, P. Loison, J. M. Perrier-Cornet and P. Gervais (2011). "Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90(4): 1409-1417.
- Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh and P. Setlow (2000). "Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(3): 548-572.
- Nielsen, C. K., J. Kjems, T. Mygind, T. Snabe and R. L. Meyer (2016). "Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media." *Front. Microbiol.* 7.

- O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." *Mol. Microbiol.* 30(2): 295-304.
- Otter, J. A., S. Mepham, B. Athan, D. Mack, R. Smith, M. Jacobs and S. Hopkins (2016). "Terminal decontamination of the Royal Free London's high-level isolation unit after a case of Ebola virus disease using hydrogen peroxide vapor." *Am. J. Infect. Control.* 44(2): 233-235.
- Paidhungat, M., B. Setlow, W. B. Daniels, D. Hoover, E. Papafragkou and P. Setlow (2002). "Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure." *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 3172-3175.
- Paidhungat, M., B. Setlow, A. Driks and P. Setlow (2000). "Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid." *J. Bacteriol.* 182(19): 5505-5512.
- Pajkos, A., K. Vickery and Y. Cossart (2004). "Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination?" *J. Hosp. Infect.* 58(3): 224-229.
- Paredes-Sabja, D., D. Raju, J. A. Torres and M. R. Sarker (2008). "Role of small, acid-soluble spore proteins in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to chemicals." *Int. J. Food Microbiol.* 122(3): 333-335.
- Paredes, J., M. Alonso-Arce, C. Schmidt, D. Valderas, B. Sedano, J. Legarda, F. Arizti, E. Gomez, A. Aguinaga, J. L. Del Pozo and S. Arana (2014). "Smart central venous port for early detection of bacterial biofilm related infections." *Biomedical Microdevices* 16(3): 365-374.
- Parsek, M. R. and T. Tolker-Nielsen (2008). "Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Curr. Opin. Microbiol.* 11(6): 560-566.
- Patino, J. M. R., C. C. Sanchez and M. R. R. Nino (2008). "Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations." *Adv. Colloid. Interfac.* 140(2): 95-113.
- Pereira, S. S. P., H. M. de Oliveira, R. N. T. Turrini and R. A. Lacerda (2015). "Disinfection with sodium hypochlorite in hospital environmental surfaces in the reduction of contamination and infection prevention: a systematic review." *Revista Da Escola De Enfermagem Da Usp* 49(4): 675-681.
- Pesci, E. C. and B. H. Iglewski (1997). "The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing." *Trends Microbiol.* 5(4): 132-134; discussion 134-135.
- Piggot, P. J. and J. G. Coote (1976). "Genetic Aspects of Bacterial Endospore Formation." *Bacteriol. Rev.* 40(4): 908-962.
- Piggot, P. J. and D. W. Hilbert (2004). "Sporulation of *Bacillus subtilis*." *Curr. Opin. Microbiol.* 7(6): 579-586.
- Pizarro-Guajardo, M., P. Calderon-Romero, P. Castro-Cordova, P. Mora-Urbe and D. Paredes-Sabja (2016). "Ultrastructural Variability of the Exosporium Layer of *Clostridium difficile* Spores." *Appl. Environ. Microbiol.* 82(7): 2202-2209.
- Plomp, M., J. M. McCaffery, I. Cheong, X. Huang, C. Bettegowda, K. W. Kinzler, S. B. Zhou, B. Vogelstein and A. J. Malkin (2007). "Spore coat architecture of *Clostridium novyi* NT SporeS." *J. Bacteriol.* 189(17): 6457-6468.
- Popham, D. L. (2002). "Specialized peptidoglycan of the bacterial endospore: the inner wall of the lockbox." *Cell. Mol. Life Sci.* 59(3): 426-433.
- Postgate, J. (1990). "The microbes that would not die." *New Sci.* 127(1726): 32-35.
- Pouvreau, J. (2002). Contribution à la modélisation de la décontamination par mousse liquide: étude expérimentale et théorique de l'écoulement de la mousse et du film liquide formé en paroi, Grenoble INPG.

- Power, E. G. M., B. N. Dancer and A. D. Russell (1988). "Emergence of Resistance to Glutaraldehyde in Spores of *Bacillus-Subtilis*-168." *Fems Microbiol. Lett.* 50(2-3): 223-226.
- Pratt, L. A. and R. Kolter (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." *Mol. Microbiol.* 30(2): 285-293.
- Puga, C. H., C. SanJose and B. Orgaz (2016). "Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan." *Food Control* 65: 143-151.
- Rasamiravaka, T., Q. Labtani, P. Duez and M. El Jaziri (2015). "The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms." *Biomed. Res. Int.*
- Rastogi, V. K., L. S. Smith, L. Wallace and S. F. Tomasino (2013). "Modified AOAC Three Step Method (Official Method 2008.05): Consolidation of Fractions B and C." *J. AOAC Int.* 96(5): 947-950.
- Rastogi, V. K., L. Wallace, L. S. Smith, S. P. Ryan and B. Martin (2009). "Quantitative method to determine sporicidal decontamination of building surfaces by gaseous fumigants, and issues related to laboratory-scale studies." *Appl. Environ. Microbiol.* 75(11): 3688-3694.
- Reineke, K., A. Mathys, V. Heinz and D. Knorr (2013). "Mechanisms of endospore inactivation under high pressure." *Trends Microbiol.* 21(6): 296-304.
- Reisner, A., J. A. J. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner and S. Molin (2003). "Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms." *Mol. Microbiol.* 48(4): 933-946.
- Ren, D., J. S. Madsen, S. J. Sorensen and M. Burmolle (2015). "High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation." *ISME J* 9(1): 81-89.
- Renner, L. D. and D. B. Weibel (2011). "Physicochemical regulation of biofilm formation." *MRS Bull* 36(5): 347-355.
- Richards, J. J. and C. Melander (2009). "Controlling Bacterial Biofilms." *Chembiochem.* 10(14): 2287-2294.
- Riesenman, P. J. and W. L. Nicholson (2000). "Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation." *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2): 620-626.
- Rios-Castillo, A. G., F. Gonzalez-Rivas and J. J. Rodriguez-Jerez (2017). "Bactericidal Efficacy of Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria on Stainless Steel Surfaces." *J. Food Sci.* 82(10): 2351-2356.
- Roder, H. L., P. K. Raghupathi, J. Herschend, A. Brejnrod, S. Knochel, S. J. Sorensen and M. Burmolle (2015). "Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment." *Food Microbiol.* 51: 18-24.
- Rogers, J. V., W. R. Richter, Y. W. Choi, E. J. Fleming, A. M. Shesky, J. Cui, M. L. Taylor, K. B. Riggs, Z. J. Willenberg and H. J. Stone (2006). *Evaluation of Spray-Applied Sporicidal Decontamination Technologies.* Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency. EPA/600/R-06/146.
- Rogers, J. V., C. L. Sabourin, Y. W. Choi, W. R. Richter, D. C. Rudnicki, K. B. Riggs, M. L. Taylor and J. Chang (2005). "Decontamination assessment of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, and *Geobacillus stearothermophilus* spores on indoor surfaces using a hydrogen peroxide gas generator." *J. Appl. Microbiol.* 99(4): 739-748.

- Russell, A. D. (1990). "Bacterial Spores and Chemical Sporicidal Agents." *Clin. Microbiol. Rev.* 3(2): 99-119.
- Russotto, V., A. Cortegiani, T. Fasciana, P. Iozzo, S. M. Raineri, C. Gregoretti, A. Giammanco and A. Giarratano (2017). "What Healthcare Workers Should Know about Environmental Bacterial Contamination in the Intensive Care Unit." *Biomed. Res. Int.*
- Rutter, P. R., F. B. Dazzo, R. Freter, D. Gingell, G. W. Jones, S. Kjelleberg, K. C. Marshall, H. Mrozek, E. Rades-Rohkohl, I. D. Robb, M. Silverman and S. Tylewska (1984). *Mechanisms of Adhesion*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Ryan, S. P., S. D. Lee, M. W. Calfee, J. P. Wood, S. McDonald, M. Clayton, N. Griffin-Gatchalian, A. Touati, L. Smith and M. Nysewander (2014). "Effect of inoculation method on the determination of decontamination efficacy against *Bacillus* spores." *J. Microbiol. Biotech.* 30(10): 2609-2623.
- Sabbah, S., S. Springthorpe and S. A. Sattar (2010). "Use of a Mixture of Surrogates for Infectious Bioagents in a Standard Approach to Assessing Disinfection of Environmental Surfaces." *Appl. Environ. Microbiol.* 76(17): 6020-6022.
- Sabli, M. Z. H., P. Setlow and W. M. Waites (1996). "The effect of hypochlorite on spores of *Bacillus subtilis* lacking small acid-soluble proteins." *Letts. Appl. Microbiol.* 22(6): 405-407.
- Sagripani, J. L. and A. Bonifacino (1996). "Comparative Sporicidal Effects of Liquid Chemical Agents." *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2): 545-551.
- Sagripani, J. L. and A. Bonifacino (2000). "Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms." *J. AOAC Int.* 83(6): 1415-1422.
- Salager, J. L. and L. Choplin (2008). "Mousses : Formation, formulation et propriétés." In *Techniques de l'Ingénieur Génie des Procédés(J2-200)*: 1-14.
- Salas-Pacheco, J. A., B. Setlow, P. Setlow and M. Pedraza-Reyes (2005). "Role of the Nfo (YqfS) and ExoA apurinic/apyrimidinic endonucleases in protecting *Bacillus subtilis* spores from DNA damage." *J. Bacteriol.* 187(21): 7374-7381.
- Santos, A. P. A., E. Watanabe and D. de Andrade (2011). "Biofilm on Artificial Pacemaker: Fiction or Reality?" *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 97(5): E113-E119.
- Sarkar, S., J. Mukherjee and D. Roy (2009). "Antibiotic Production by a Marine Isolate (MS 310) in An Ultra-low-speed Rotating Disk Bioreactor." *Biotechnol. Bioproc. E.* 14(6): 775-780.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton and D. G. Davies (2002). "Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm." *J. Bacteriol.* 184(4): 1140-1154.
- Schalk, I. J. and L. Guillon (2013). "Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis." *Environ. Microbiol.* 15(6): 1661-1673.
- Schmitt, K. and N. A. Zacchia (2012). "Total decontamination cost of the anthrax letter attacks." *Biosecur Bioterror* 10(1): 98-107.
- Setlow, B., S. Atluri, R. Kitchel, K. Koziol-Dube and P. Setlow (2006). "Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins." *J. Bacteriol.* 188(11): 3740-3747.
- Setlow, B., K. A. McGinnis, K. Ragkousi and P. Setlow (2000). "Effects of major spore-specific DNA binding proteins on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties." *J. Bacteriol.* 182(24): 6906-6912.

- Setlow, B. and P. Setlow (1995). "Small, Acid-Soluble Proteins Bound to DNA Protect *Bacillus-Subtilis* Spores from Killing by Dry Heat." *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7): 2787-2790.
- Setlow, P. (1992). "I Will Survive - Protecting and Repairing Spore DNA." *J. Bacteriol.* 174(9): 2737-2741.
- Setlow, P. (2001). "Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light." *Environ. Mol. Mutagen.* 38(2-3): 97-104.
- Setlow, P. (2003). "Spore germination." *Curr. Opin. Microbiol.* 6(6): 550-556.
- Setlow, P. (2006). "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals." *J. Appl. Microbiol.* 101(3): 514-525.
- Setlow, P. (2006). "Symposium articles: Spore forming bacteria - emerging and re-emerging issues - Preface." *J. Appl. Microbiol.* (3): 505-506.
- Setlow, P. (2007). "I will survive: DNA protection in bacterial spores." *Trends Microbiol.* 15(4): 172-180.
- Setlow, P. (2013). "Summer meeting 2013-when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species." *J. Appl. Microbiol.* 115(6): 1251-1268.
- Setlow, P. (2014). "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know." *J. Bacteriol.* 196(7): 1297-1305.
- Setlow, P. (2014). "Spore Resistance Properties." *Microbiol. Spectr.* 2(5).
- Setlow, P. and S. B. Young (2003). "Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide." *J. Appl. Microbiol.* 95: 54-67.
- Shaker, L. A., B. N. Dancer, A. D. Russell and J. R. Furr (1988). "Emergence and Development of Chlorhexidine Resistance during Sporulation of *Bacillus-Subtilis*-168." *Fems Microbiol. Lett.* 51(1): 73-76.
- Shaker, L. A., J. R. Furr and A. D. Russell (1988). "Mechanism of Resistance of *Bacillus-Subtilis* Spores to Chlorhexidine." *J. Appl. Bacteriol.* 64(6): 531-539.
- Siedenbiedel, F. and J. C. Tiller (2012). "Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles." *Polymers* 4(1): 46.
- Simoës, M., L. C. Simoës and M. J. Vieira (2008). "Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses." *Int. J. Food Microbiol.* 128(2): 309-316.
- Simon, J.-L. (2001). "Gomme xanthane : agent viscosant et stabilisant." *Techniques de l'ingénieur F4300 V1.*
- Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh and E. P. Greenberg (2000). "Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms." *Nature* 407: 762.
- Siregar, A., M. Kleber, R. Mikutta and R. Jahn (2005). "Sodium hypochlorite oxidation reduces soil organic matter concentrations without affecting inorganic soil constituents." *Eur. J. Soil Sci.* 56(4): 481-490.
- Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith and R. L. Kent, Jr. (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." *J. Clin. Periodontol* 25(2): 134-144.
- Sonenshein, A. L. (2000). "Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*." *Curr. Opin. Microbiol.* 3(6): 561-566.
- Soni, K. A., A. K. Balasubramanian, A. Beskok and S. D. Pillai (2008). "Zeta potential of selected bacteria in drinking water when dead, starved, or exposed to minimal and rich culture media." *Curr. Microbiol.* 56(1): 93-97.
- Spoering, A. L. and K. Lewis (2001). "Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials." *J. Bacteriol.* 183(23): 6746-6751.

- Stavans, J. (1999). Foam Evolution in Two Dimensions. Foams and Emulsions. J. F. Sadoc and N. Rivier. Dordrecht, Springer Netherlands: 91-104.
- Steichen, C. T., J. F. Kearney and C. L. Turnbough (2007). "Non-uniform assembly of the *Bacillus anthracis* exosporium and a bottle cap model for spore germination and outgrowth." *Mol. Microbiol.* 64(2): 359-367.
- Stewart, P. S., F. Roe, J. Rayner, J. G. Elkins, Z. Lewandowski, U. A. Ochsner and D. J. Hassett (2000). "Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2): 836-838.
- Stragier, P. and R. Losick (1996). "Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*." *Annu. Rev. Genet.* 30: 297-341.
- Sugiyama, H. (1951). "Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*." *J. Bacteriol.* 62(1): 81-96.
- Sunde, E. P., P. Setlow, L. Hederstedt and B. Halle (2009). "The physical state of water in bacterial spores." *P. Natl. Acad. Sci. USA* 106(46): 19334-19339.
- Swerdlow, B. M., B. Setlow and P. Setlow (1981). "Levels of H⁺ and other mono-valent cations in dormant and germinating spores of *Bacillus-megaterium*." *J. Bacteriol.* 148(1): 20-29.
- Talwalkar, J. S. and T. S. Murray (2016). "The Approach to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis." *Clin. Chest Med.* 37(1): 69.
- Tennen, R., B. Setlow, K. L. Davis, C. A. Loshon and P. Setlow (2000). "Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid." *J. Appl. Microbiol.* 89(2): 330-338.
- Todd, S. J., A. J. Moir, M. J. Johnson and A. Moir (2003). "Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium." *J. Bacteriol.* 185(11): 3373-3378.
- Tojo, S., K. Hirooka and Y. Fujita (2013). "Expression of kinA and kinB of *Bacillus subtilis*, necessary for sporulation initiation, is under positive stringent transcription control." *J. Bacteriol.* 195(8): 1656-1665.
- Tomasino, S. F., V. K. Rastogi, L. Wallace, L. S. Smith, M. A. Hamilton and R. M. Pines (2010). "Use of Alternative Carrier Materials in AOAC Official Method(SM) 2008.05, Efficacy of Liquid Sporicides Against Spores of *Bacillus subtilis* on a Hard, Nonporous Surface, Quantitative Three-Step Method." *J. AOAC Int.* 93(1): 259-276.
- Turnbull, P. C. (2002). "Introduction: anthrax history, disease and ecology." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 271: 1-19.
- Valdebenito, B., P. O. Tullume-Vergara, W. Gonzalez, J. Kreth and R. A. Giacaman (2018). "In silico analysis of the competition between *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus mutans* in the dental biofilm." *Mol. Oral Microbiol.* 33(2): 168-180.
- van Beilen, J. W. A. and S. Brul (2013). "Compartment-specific pH monitoring in *Bacillus subtilis* using fluorescent sensor proteins: a tool to analyze the antibacterial effect of weak organic acids." *Front. Microbiol.* 4.
- van Bokhorst-van de Veen, H., H. Xie, E. Esveld, T. Abee, H. Mastwijk and M. Nierop Groot (2015). "Inactivation of chemical and heat-resistant spores of *Bacillus* and *Geobacillus* by nitrogen cold atmospheric plasma evokes distinct changes in morphology and integrity of spores." *Food Microbiol.* 45(Pt A): 26-33.
- Van Houdt, R. and C. Michiels (2010). "Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface." *J. Appl. Microbiol.* 109(4): 1117-1131.

- Waller, L. N., N. Fox, K. F. Fox, A. Fox and R. L. Price (2004). "Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*." *J. Microbiol. Methods* 58(1): 23-30.
- Wang, H. H., L. L. Cai, Y. H. Li, X. L. Xu and G. H. Zhou (2018). "Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants." *Food Control* 91: 397-403.
- Wang, J. L., A. V. Nguyen and S. Farrokhpay (2016). "Effects of surface rheology and surface potential on foam stability." *Colloid. Surface A* 488: 70-81.
- Warth, A. D., D. F. Ohye and W. G. Murrell (1963). "The composition and structure of bacterial spores." *J. Cell. Biol.* 16: 579-592.
- Watabe, K., S. Iida, R. Wada, T. Ichikawa and M. Kondo (1980). "Characterization of forespores isolated from *Bacillus subtilis* at each stage of sporulation." *Microbiol. Immunol.* 24(1): 79-82.
- Watanabe, T., S. Furukawa, J. Hirata, T. Koyama, H. Ogihara and M. Yamasaki (2003). "Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores by High-Pressure Carbon Dioxide Treatment." *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12): 7124-7129.
- Weaire, D. and R. Phelan (1996). "The physics of foam." *J. Phys.: Condens. Matter* 8(47): 9519-9524.
- Wienczek, K. M., N. A. Klapes and P. M. Foegeding (1990). "Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* Spores." *Appl. Environ. Microbiol.* 56(9): 2600-2605.
- Wilcox, M. H. and W. N. Fawley (2000). "Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*." *Lancet* 356(9238): 1324.
- Wood, J. P., Y. W. Choi, J. V. Rogers, T. J. Kelly, K. B. Riggs and Z. J. Willenberg (2011). "Efficacy of liquid spray decontaminants for inactivation of *Bacillus anthracis* spores on building and outdoor materials." *J. Appl. Microbiol.* 110(5): 1262-1273.
- Wood, J. P., K. M. Meyer, T. J. Kelly, Y. W. Choi, J. V. Rogers, K. B. Riggs and Z. J. Willenberg (2015). "Environmental Persistence of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* Spores." *PLoS One* 10(9): e0138083.
- Wu, H., C. Moser, H. Z. Wang, N. Hoiby and Z. J. Song (2015). "Strategies for combating bacterial biofilm infections." *Int. J. Oral Sci.* 7(1): 1-7.
- Young, S. B. and P. Setlow (2003). "Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide." *J. Appl. Microbiol.* 95(1): 54-67.
- Young, S. B. and P. Setlow (2004). "Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by Decon and Oxone™, two general decontaminants for biological agents." *J. Appl. Microbiol.* 96(2): 289-301.
- Ziuzina, D., S. Patil, P. J. Cullen, K. M. Keener and P. Bourke (2014). "Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce." *Food Microbiol.* 42: 109-116.
- Zuniga, R. N. and J. M. Aguilera (2008). "Aerated food gels: fabrication and potential applications." *Trends Food Sci. Technol.* 19(4): 176-187.

Résumé

Il existe de nombreuses technologies de décontamination, néanmoins les spores et les biofilms bactériens demeurent une préoccupation majeure dans de nombreux domaines, tels que le secteur hospitalier, alimentaire et de la biodéfense car elles sont résistantes. Une mousse novatrice contenant un biocide (l'hypochlorite de sodium ou le peroxyde d'hydrogène) et un agent stabilisant (le Xanthane) a été étudiée pour répondre à ce besoin. Cette mousse a la capacité d'être mise en œuvre de différentes façons sur le terrain par : pulvérisation au sol ; talochage et pulvérisation sur les murs ; remplissage de pièces entières (murs et sols). Le travail de thèse est d'évaluer les modes d'action biocide de ces mousses sur les spores et les biofilms. Afin d'étudier le mode d'action de ces mousses des protocoles expérimentaux ont été mis au point sur les spores et les biofilms suivant leurs futures mises en œuvre (horizontale, verticale et remplissage) et suivant différents facteurs environnementaux pouvant influencer leur efficacité de décontamination (températures, salissures, matériaux, ...). L'ensemble de ce travail de thèse a permis de distinguer l'intérêt de la mousse au Xanthane contenant NaOCl 5% par rapport à celle H₂O₂ 12% pour répondre aux besoins spécifiques de la décontamination des agents de la menace biologique. Cette mousse permet une décontamination rapide de 7 logs de spores en 30 minutes pour chacune des trois voies de mise en œuvre à 20°C. De plus, elle permet la destruction de biofilms contenant 10⁷ de bactéries/cm² en 1 heure maximum sur un support horizontal et par remplissage. Cette mousse NaOCl est suffisamment mature pour pouvoir réaliser un futur transfert industriel.

Mots clés : Spores, Biofilms, Décontamination biologique, Mousse, Hypochlorite de sodium, Peroxyde d'hydrogène, Film de mouillage, Cinétique

Abstract

Foam biocidal mechanisms for biological decontamination of two bacterial resistances: spores and biofilms

Several decontamination technologies exist, however bacterial spores and biofilms remain a concern in a lot of fields, like hospital, alimentary and military. A new foam containing a biocide (sodium hypochlorite or hydrogen peroxide) and a stabilizing agent (Xanthan) has been studied to answer this problematic. This foam can be used in different ways on the field following contaminations: grounds' spraying, walls' covering and spraying, full pieces' filling (walls and ground). The goal of this thesis is to evaluate the biocide efficiency of these foams on spores and biofilms. We optimized experimental protocols in order to study mechanisms of foams' action on spores and biofilms based on their future applications (horizontal, vertical and filling) and depending on different environmental factors which may impact foam decontamination efficiencies (materials, temperatures, soil, ...). This thesis work enabled to highlight the Xanthan foam containing 5% NaOCl from the one including 12% H₂O₂ in military sector. This foam allows a rapid decontamination, about 7 logs of spores in 30 minutes, for each of the three ways of use at 20°C. Moreover, the destruction of biofilms containing 10⁷ logs of bacteria/cm² was achieved in 1 hour on a horizontal support by filling. This NaOCl foam is ready to be used for industrials.

Keywords: Spores, Biofilms, Decontamination, Foam, Sodium hypochlorite, Hydrogen peroxide, Wetting film, Kinetic