



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Maritxu LABADIE

Le 16 octobre 2019

**Implication des composantes matricielle et cellulaire de biofilms
bactériens modèles en réponse à des traitements physiques :
standardisation d'outils d'analyse et application aux technologies
jet de plasma froid et LED UV-C.**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Ingénieries microbienne et enzymatique**

Unité de recherche :

LBAE - Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale

Thèse dirigée par

Catherine FONTAGNE - FAUCHER et Claire-Emmanuelle MARCATO-ROMAIN

Jury

M. Patrick DI MARTINO, Rapporteur

Mme Maëlle MOLMERET, Rapporteur

M. Vincent SOL, Rapporteur

M. Nofel MERBAHI, Examineur

M. Yoan PECHAUD, Examineur

Mme Catherine FONTAGNE-FAUCHER, Directrice de thèse

Mme Claire-Emmanuelle MARCATO-ROMAIN, Co-directrice de thèse

À mes parents

À ma famille

À Thibault

À Mamidou

Ce travail de thèse s'est déroulé à l'IUT « A » Paul Sabatier d'AUCH, au sein du laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE EA 4565).

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrantes de thèse, Catherine Fontagné-Faucher et Claire-Emmanuelle Marcato-Romain pour les connaissances qu'elles m'ont apportées, et également pour toute la confiance qu'elles m'ont accordée pour réaliser ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse :

M. Vincent Sol, Mme Maëlle Molmeret et M. Patrick Di Martino, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur.

M. Nofel Merbahi et M. Yoan Pechaud pour avoir accepté d'être examinateurs dans mon jury de thèse.

Je remercie également la région Occitanie et les collectivités locales et territoriales, le conseil départemental du Gers et l'IUT « A » Paul Sabatier d'Auch dont les financements m'ont permis de mener à bien cette thèse.



Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire LBAE, pour leur accueil, leur aide et leur convivialité.

Je tenais à remercier en particulier, Coralie Coudray-Meunier, pour son amitié, son aide, son écoute, tout au long de ma thèse.

Je remercie également Alice Baldy, pour sa contribution aux travaux de recherche et son amitié.

Merci à tous les doctorants et stagiaires, avec lesquels j'ai pu profiter des accotés et passer de bons moments. Merci à Benoit, Enguerrand, Maël, Juliette, Irina, Meriem, Fanny, Manon, Corentin, Constance, Kevin, Morgane.

Je remercie toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser mes travaux et mener à bien mes expériences. Merci à Philippe, Eliane, Laurie.

Je tenais également à remercier tous les membres du laboratoire CESBIO pour leur gentillesse.

Je remercie aussi l'équipe PRHE du laboratoire LAPLACE pour la confiance accordée lors de cette collaboration et tout particulièrement à Frédéric Marchal.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Yassine Nait-Chabane, Bruno Gabriel, Nofel Merbahi, Maialen Barret, Damien Seyer, Elisabeth Girbal- Neuhauser, pour leur intérêt et le temps qu'ils m'ont accordés.

Je tiens également à remercier ma famille et ma belle-famille mais tout particulièrement mes parents, Cathy et Jean-Claude, ma sœur, Laure et mon frère, Patxi, pour leur soutien et leurs encouragements depuis toujours.

Et un très grand merci à Thibault, pour m'avoir soutenu et pour avoir rendu le quotidien facile dans les moments difficiles.

Résumé

Les biofilms bactériens posent de nombreux problèmes dans les domaines de la santé, de l'agroalimentaire et de différents secteurs industriels. Un biofilm est une communauté de micro-organismes fixés à une surface, maintenus et protégés par une matrice extracellulaire constituée de différents polymères. L'inactivation de ces biofilms passe traditionnellement par l'utilisation de traitements chimiques ou thermiques. Récemment, des techniques physiques à faible impact environnemental tels que les jets de plasma froid et les diodes électroluminescentes (LED) émettant dans les UV ont été étudiées pour la décontamination/stérilisation de surfaces. Du fait de la complexité structurale des biofilms et de la diversité des paramètres physiques de ces dispositifs, l'essor de ces technologies innovantes et durables pour des applications anti-biofilms demandent de nombreuses améliorations méthodologiques permettant la quantification ou la qualification de leurs effets biologiques.

Lors de cette étude, deux souches bactériennes ayant des caractéristiques pariétale et matricielle différentes ont été choisies : *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (Gram⁺, production contrôlable d'une matrice exopolysaccharidique) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Gram⁻, matrice complexe riche en protéines et ADN). Les systèmes physiques utilisés correspondent à un prototype de jet de plasma froid qui génère des espèces réactives de l'azote (RNS) et de l'oxygène (ROS) et à un dispositif LED émettant dans les UV-C à 280 nm. Dans un premier temps, une méthodologie a été définie afin d'obtenir des biofilms aériens (sur des membranes) de façon reproductible et standardisée en termes de densité cellulaire et de matrice extracellulaire. L'effet biocide des traitements LED UV-C et jet de plasma appliqués, évalué par dénombrement bactérien classique, a été comparé entre des cellules déposées sur membrane et des biofilms de 24 heures. Les résultats du traitement au jet de plasma ont permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle protecteur de la matrice extracellulaire, en lien avec sa composition (quantité et nature des polymères). Dans le cas du traitement LED UV-C et en lien avec les propriétés d'absorbance des composants matriciels, l'effet protecteur de la matrice a été démontré pour *P. aeruginosa*. Un autre aspect de ces travaux a concerné le développement de méthodes permettant d'évaluer de façon plus précise les effets des traitements physiques sur la composante cellulaire des biofilms. La méthode qPCR de viabilité (ou PMA/EMA-qPCR) n'a pas permis d'aboutir à une quantification satisfaisante des cellules de *P. aeruginosa* ou de *L. citreum*. En revanche, une méthode basée sur la réduction métabolique de la résazurine par les cellules a pu être proposée.

Ces études contribuent à renseigner sur l'importance du paramètre de densité cellulaire et de caractérisation de la matrice extracellulaire dans l'évaluation de méthodes physiques d'inactivation des biofilms bactériens et soulignent la nécessité de continuer à développer des outils d'analyses adaptés à cette problématique.

Mots clés : Biofilms, Matrice, Dextranes, Plasma froid, Jet de plasma, LED UV-C, Effet biocide, Viabilité cellulaire, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc citreum*, qPCR de viabilité, Résazurine

Abstract

Bacterial biofilms are an issue in several sectors such as health, agri-food and industry. Biofilms are composed of a community of microorganisms attached to a surface and maintained and protected by an extracellular matrix of different bio-polymers. Conventional biofilm eradication methods involve the use of chemical or thermal treatments. More recently, new physical techniques with lower environmental impacts such as cold plasma jets and light emitting diodes (LED) emitting in the UV, have been studied for the decontamination/sterilization of surfaces. Due to the structural complexity of biofilms and the diversity of physical parameters of the device, developing such innovative and sustainable technologies for anti-biofilm applications require major methodological improvements in order to correctly quantify or qualify their biological effects. In this study, two bacterial strains exposing different parietal and extracellular matrix characteristics were chosen: *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (Gram +, controllable production of an exopolysaccharide matrix) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Gram-, protein and e-DNA rich complex matrix). The treatment devices involved the use of a prototype cold plasma jet able to generate reactive nitrogen species (RNS) and oxygen (ROS), and a home-made LED device emitting in the UV-C at 280 nm. Firstly, a methodology was defined to obtain reproducible and standardized surface biofilms (on membranes) in terms of cell density and extracellular matrix. The biocidal effect of UV-C LED applications and plasma jet treatments were measured by conventional bacterial counts and comparing values between membrane-deposited cells and 24-hour grown biofilms. The results of the plasma jet treatment suggested that the extracellular matrix had a protective role and this in relation to its biochemical composition (amount and composition of the bio-polymers). In the case of UV-C LED treatment, and in relation to the absorbance properties of the matrix components, the protective effect of the matrix was demonstrated only for *P. aeruginosa*. Another feature of this work has been the exploitation of methods to more accurately assess the effects of the physical treatments on the cellular compartment of biofilms. The qPCR viability method (or PMA / EMA-qPCR) did not lead to satisfactory quantifications of *P. aeruginosa* or *L. citreum* cells. In contrast, a method based on metabolic reduction of resazurin by cells could be proposed. This study highlights the importance of considering cell density and characterizing extracellular matrix compounds when evaluating bacterial biofilm eradication methods, and moreover underlines the need to further develop analytical tools adapted to this problematic.

Keywords : Biofilms, Matrix, Dextrane, Cold plasma, plasma jet, LED UV-C, Biocidal effect, Cellular viability, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc citreum*, viability qPCR, Resazurin

Production scientifique

Publications:

Soumise

- Response of controlled cell load biofilms to cold atmospheric plasma jet: evidence of extracellular matrix contribution

Maritxu Labadie, Frédéric Marchal, Nofel Merbahi, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Catherine Fontagné-Faucher and Claire-Emmanuelle Marcato-Romain

Article en révision dans « Journal of Applied Microbiology »

A soumettre

- A dynamic resazurin assay to quantify planktonic and biofilm cells including lactic acid bacteria

Maritxu Labadie, Irina Randrianjatovo-Gbalou, Catherine Fontagné-Faucher and Claire-Emmanuelle Marcato-Romain

Article rédigé pour soumission à « Journal of Microbiological Methods »

- Impact of cell load and extracellular matrix on biofilm tolerance to ultraviolet light emitting diode

Maritxu Labadie, Gaëtan Wattieaux, Frédéric Marchal, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Catherine Fontagné-Faucher and Claire-Emmanuelle Marcato-Romain

Article rédigé pour soumission à « International Journal of Antimicrobial Agents »

Communications orales :

- Impact de la matrice des biofilms bactériens en réponse au traitement par plasma froids

Maritxu Labadie, Frédéric Marchal, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Catherine Fontagné-Faucher, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain

8^{eme} Réseau National des Biofilms 5-6 décembre 2017, Clermont-Ferrand (France)

- Inactivation of biofilms by air plasma jet at atmospheric pressure

Maritxu Labadie, Nofel Merbahi, Frédéric Marchal, Mohammed Yousfi, Olivier Eichwald, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain and Catherine Fontagné-Faucher

4th International Workshop on Plasma Science & Entrepreneurship 30 November and 1 December 2017, Orléans (France)

- Réponse de biofilms bactériens modèles à un jet de plasma froid à pression atmosphérique

Maritxu Labadie, Frédéric Marchal, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Gaëtan Wattieaux, Jean-Pierre Gardou, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain, Catherine Fontagné-Faucher

GDR AbioPlas 3-4 novembre 2016, Albi (France)

Posters :

- Impact of cell load and extracellular matrix on model bacterial biofilm tolerance to ultraviolet-C light emitting diode

Maritxu Labadie, Frédéric Marchal, Nofel Merbahi, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Catherine Fontagné-Faucher, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain

MicrobiOccitanie 18 au 20 février 2019, Montpellier (France)

- Improvement of a resazurin microtiter plate assay to quantify the viability of bacterial planktonic cultures and biofilms.

Claire-Emmanuelle Marcato-Romain, Maritxu Labadie, Catherine Fontagné-Faucher

MicrobiOccitanie 18 au 20 février 2019, Montpellier (France)

- Matrix impact on bacterial biofilm responses to cold plasma treatments

Maritxu Labadie, Frédéric Marchal, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Cathy Fontagné-Faucher, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain

Eurobiofilm 19-22 September 2017, Amsterdam (Pays-Bas)

- Inactivation de biofilm bactériens par jet de plasma froid et LED UV-C

Maritxu Labadie, Frédéric Marchal, Gaëtan Wattieaux, Elisabeth Girbal-Neuhauser, Catherine Fontagné-Faucher

7^{ème} Réseau National des Biofilms 3 – 4 décembre 2015, Toulouse (France)

Table des matières

Résumé	6
Abstract	7
Production scientifique.....	8
Liste des figures	15
Liste des tableaux	22
Liste des abréviations	23
<i>Introduction générale</i>	25
<i>Partie 1-Revue bibliographique</i>	29
1 Description des biofilms bactériens	30
1.1 Les biofilms	30
1.1.1 Définition	30
1.1.2 Formation des biofilms	31
1.2 Composante matricielle des biofilms	34
1.2.1 Exopolysaccharides.....	35
1.2.2 Exoprotéines.....	38
1.2.3 ADN extracellulaire	40
1.3 Composante cellulaire des biofilms	41
1.3.1 Structure de l'enveloppe bactérienne	41
1.3.2 La croissance cellulaire	44
A. En mode planctonique	44
B. En mode biofilm	45
1.4 Persistance des biofilms.....	48
2 Décontamination par les technologies Plasma froid et LED UV-C.....	50
2.1 Les plasmas froids	51
2.1.1 Description générale.....	51
2.1.2 Plasmas froids à la pression atmosphérique	53
2.1.3 Domaines d'application des plasmas froids.....	56
2.1.3.1 Mécanismes d'action des plasmas froids sur les bactéries.....	57

2.1.3.2	Inactivation des micro-organismes sous la forme planctonique	60
2.1.3.3	Inactivation des micro-organismes sous la forme de biofilm	63
2.2	Les diodes électroluminescentes (LED) dans les ultraviolets C	67
2.2.1	Les ultraviolets	67
2.2.2	Les diodes électroluminescentes (LEDs)	69
2.2.3	Applications des ultraviolets C pour la décontamination	71
2.2.3.1	Les mécanismes d'action des UV-C	72
2.2.3.2	Limitations de l'effet bactéricide des UV-C	74
2.2.3.3	Applications des LED UV-C sur des bactéries planctoniques	75
2.2.3.4	Application des LED UV-C sur des biofilms	76
3	Méthodes d'analyse de l'efficacité anti-biofilms	78
3.1	Méthodes d'analyse de la composante cellulaire	80
3.1.1	Dénombrement des cellules viables par culture	84
3.1.2	Kit Live & Dead® (Propidium iodide et SYTO 9)	84
3.1.3	Méthode moléculaire de viabilité qPCR (v- qPCR)	85
3.1.3.1	Principe des méthodes moléculaires qPCR et viabilité qPCR	85
3.1.3.2	Les marqueurs EMA/PMA et leur chimie	87
3.1.3.3	Paramètres à contrôler pour les applications de l'EMA/PMA vqPCR	89
3.1.3.4	Application de la viabilité q-PCR sur biofilms	92
3.1.4	Méthode basée sur l'activité métabolique - Résazurine	93
3.1.4.1	Chimie de la résazurine	93
3.1.4.2	Paramètres à contrôler lors de l'essai résazurine	94
3.1.4.3	Application aux biofilms modèles mono-espèces	98
4	Souches modèles	101
4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101
4.1.1	Taxonomie et caractéristiques physiologiques	101
4.1.2	Habitat et pouvoir pathogène	103
4.1.3	La souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	105
4.2	<i>Leuconostoc citreum</i>	106
4.2.1	Taxonomie et caractéristiques physiologiques	106
4.2.2	Habitat et utilisation	109

4.2.3	<i>L. citreum</i> NRRL B-1299	110
	<i>Objectifs de la thèse</i>	111
	<i>Partie 2-Résultats</i>	114
	<i>Matériels et méthodes</i>	115
1	Milieus et conditions de culture des souches bactériennes.....	116
2	Formation de biofilms calibrés sur membrane d'esters de cellulose	117
2.1	Préparation de la suspension bactérienne calibrée.....	117
2.2	Inoculation par filtration des membranes d'esters de cellulose.....	117
2.3	Préparation des coupons de membranes	118
3	Analyse des biofilms	119
3.1	Analyses in situ.....	119
3.1.1	Détermination de la masse sèche.....	119
3.1.2	Spectroscopie infrarouge ATR-FTIR	119
3.1.3	Microscopie électronique à balayage	123
3.1.4	Microscopie confocale à balayage laser	124
3.2	Analyses ex situ.....	126
3.2.1	Récupération des cellules bactériennes et dénombrement.....	126
3.2.2	Analyse <i>ex situ</i> de l'ADN extracellulaire.....	127
	Quantification de l'ADN extracellulaire par marquage au picogreen	127
	Visualisation de l'ADNe par électrophorèse en gel d'agarose	128
	Amplification PCR.....	128
4	Dispositif plasma	130
5	Dispositif LED UV-C.....	133
6	Évaluation de l'effet biocide des deux dispositifs.....	136
	Inhibition de croissance d'une culture sur gélose	136
	Dénombrement de la population bactérienne sur membrane après traitement	136
7	Analyses statistiques	137
	<i>Chapitre I Validation de la formation de biofilms bactériens modèles calibrés et de l'effet biocide des traitements</i>	138
1	Validation de la formation de biofilms calibrés	140
2	Caractérisation des biofilms	143

2.1	Biomasse totale.....	143
2.1.1	Masse sèche et humidité.....	143
2.1.2	Microscopie électronique à balayage.....	144
2.1.3	Spectroscopie infrarouge (ATR-FTIR).....	146
2.2	Composés matriciels.....	150
2.2.1	Analyse du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> par microscopie confocale à balayage laser 150	
2.2.2	Analyse biochimique <i>ex situ</i> de l'ADN extracellulaire.....	151
3	Validation de l'effet biocide des dispositifs.....	154
3.1	Système plasma.....	154
3.2	Système LED UV-C.....	156
4	Conclusion.....	158
	<i>Chapitre II Évaluation de l'effet biocide d'un jet de plasma froid sur des biofilms bactériens modèles.....</i>	159
	Response of controlled cell load biofilms to cold atmospheric plasma jet: evidence of extracellular matrix contribution.....	165
	<i>Chapitre III Évaluation de l'effet biocide d'une LED UV-C sur des biofilms bactériens modèles</i>	189
	Impact of cell load and extracellular matrix on biofilm tolerance to ultraviolet-C light emitting diode.....	195
	Résultats complémentaires.....	210
	<i>Chapitre IV Développement de méthodes d'analyse de la viabilité cellulaire.....</i>	213
1	Méthode moléculaire : EMA – PMA qPCR.....	216
1.1	Matériel et méthodes.....	217
1.1.1	Cultures bactériennes et dénombrement.....	217
1.1.2	Méthodes de lyse cellulaire.....	217
1.1.3	Extraction de l'ADN génomique.....	218
1.1.4	Conditions q-PCR.....	218
1.1.4.1	Amorces utilisées.....	218
1.1.4.2	Conditions d'amplification qPCR.....	219
1.1.4.3	Quantification en ADN des échantillons.....	220

1.1.5	Traitement au PMA ou EMA des cultures bactériennes.....	220
1.1.6	Traitement statistique	221
1.2	Résultats et discussion	222
1.2.1	Quantification de <i>P. aeruginosa</i> et de <i>L. citreum</i> par qPCR.....	222
1.2.2	Comparaison de quatre méthodes de lyse cellulaire.....	223
1.2.3	Évaluation de l'efficacité des marqueurs EMA/PMA	226
1.2.3.1	Diffusion cellulaire des marqueurs.....	226
1.2.3.2	Liaison des marqueurs à l'ADN de cellules mortes	228
1.3	Conclusion.....	230
2	Méthode métabolique d'évaluation de la viabilité cellulaire : Résazurine.....	231
	A dynamic resazurin assay to quantify planktonic and biofilm cells including lactic acid bacteria	237
	Application de la méthode développée à l'évaluation de l'effet biocide de la LED UV-C.....	251
	<i>Conclusions générales et perspectives</i>	253
	Références bibliographiques	266
	Annexes	291

Liste des figures

Figure 1: Observation en microscopie à balayage d'un biofilm formé à l'interface air-liquide dans un endoscope (Pajkos et al. 2004), A) la barre représente 200 μm et B) la barre représente 5 μm	31
Figure 2 : Étapes de formation des biofilms (Lebeaux and Ghigo 2012)	32
Figure 3 : Phénotypes des colonies de <i>P. aeruginosa</i> dû à la surexpression d'ePS, A) souche de <i>P.aeruginosa</i> (mucA22), B) souche de <i>P.aeruginosa</i> ($\Delta\text{wspF}\Delta\text{pel}$) et C) souche de <i>P.aeruginosa</i> ($\Delta\text{wspF}\Delta\text{psl}$) (Limoli et al. 2015).....	36
Figure 4 : Structure chimique de différents polysaccharides; a) alginate, b) Psl, c) PIA ou polysaccharide d'adhésion intracellulaire, d) levane, e) cellulose et f) dextrane branchée en α - $(1\rightarrow3)$ (Bounaix 2010; Limoli et al. 2015)	38
Figure 5 : Composition pariétale des microorganismes Gram à positif et Gram à négatif, adapté de (Silhavy et al. 2010).....	43
Figure 6 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne, adaptée de (Talaro and Talaro 2002)	44
Figure 7 : Diversité des conditions physico-chimiques dans un biofilm immergé (Flemming et al. 2016).....	45
Figure 8 : Les différentes modifications phénotypiques pouvant se produire dans un biofilm (Dufour et al. 2012).	46
Figure 9 : Illustration des différents états physiologiques retrouvés dans un biofilm (Nocker and Camper 2009)	46
Figure 10 : Hypothèses des mécanismes de résistance des biofilms vis-à-vis de produits biocides (Lebeaux and Ghigo 2012).....	49
Figure 11 : Nombre de publications sur les plasmas froids (Misra et al. 2016)	51
Figure 12 : Représentation schématique des 4 états de la matière (http://matieretpe.e-monsite.com/pages/i-le-plasma/)	52
Figure 13 : Systèmes plasma, 1) schéma du principe et 2) Photo du dispositif	54
Figure 14 : Quelques exemples de réactions chimiques possibles au sein du plasma (Korachi and Aslan 2013), avec M : molécule cible, partenaire de collision	55

Figure 15 : Chronologie des étapes importantes des applications biomédicales des plasmas froids (Laroussi et al. 2017).....	56
Figure 16 : Hypothèse sur les mécanismes d'action des jets de plasmas froids (Bourke et al. 2017).....	58
Figure 17 : Paramètres physiques et biologiques intervenant dans l'efficacité biocide d'un traitement plasma froid – adapté de (Bourke et al. 2017)	62
Figure 18 : Effet de la densité cellulaire initiale sur l'efficacité antibactérienne d'un jet de plasma froid ; Utilisation d'un jet de plasma CP121 Plasma Demonstrator OMVE, 12 L.min ⁻¹ de gaz d'azote, d= 2,5 cm, suspensions de <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> déposées sur filtre de polycarbonate (Fernández et al. 2012)	63
Figure 19 : Cinétique d'inactivation de la population bactérienne Utilisation d'un jet de plasma commercial Atomflo 250 (Surfx Technologies) avec 20,4 L.min ⁻¹ de gaz d'hélium et 0,305 L.min ⁻¹ de gaz de néon, d= 0,7 cm, biofilm de <i>Chromobacterium violaceum</i> de 96h, en microplaques 96 puits (Abramzon et al. 2006)	64
Figure 20 : Représentation du spectre électromagnétique et quelques exemples de domaines d'application (Gwynne and Gallagher 2018)	68
Figure 21: Spectre d'émission des lampes à vapeur de mercure, trait plein : lampe à moyenne pression et pointillé : lampe à basse pression (Beck et al. 2017)	69
Figure 22 : Principe d'une diode électroluminescente, matériau de type p-n (http://leclairage.fr/knowledge-base/led/)	69
Figure 23: Spectres d'émission de LED selon la composition du semi-conducteur à température ambiante (Schubert et al. 2015)	70
Figure 24 : Formation de lésions de l'ADN après irradiation aux UV- adapté de (Kammeyer and Luiten 2015).....	73
Figure 25 : Méthodes d'analyse des biofilms modèles, adapté (Azeredo et al. 2017)	78
Figure 26 : Amplification en temps réel de concentrations d'ADN cible croissantes. L'intensité de la fluorescence émise est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'encart correspond à la droite d'étalonnage exprimant les variations de Ct en fonction de la quantité d'acide nucléique cible (www.affymetrix.com)	86
Figure 27 : Méthode PMA et EMA qPCR (d'après le site Biotium.com).....	87
Figure 28 : Structure des intercalant ; EMA et PMA (van Frankenhuyzen et al. 2011).....	87
Figure 29 : Liaison covalente du marqueur PMA à l'ADN (d'après le site Biotium.com)	88

Figure 30 : Étapes de l'approche v-qPCR et les différents paramètres pouvant varier adapté de (Emerson et al. 2017)	89
Figure 31 : Influence des cellules mortes de <i>L. pneumophila</i> sur la quantification des cellules viables <i>L. pneumophila</i> en PMA qPCR (Slimani et al. 2012)	90
Figure 32 : Réduction du signal en EMA qPCR en fonction des différentes tailles d'amplicons générés (Soejima et al. 2011)	91
Figure 33 : Conversion de la résazurine en résorufine et déshydrorésorufine.....	94
Figure 34 : Spectres d'émission de fluorescence et spectres d'absorbance des molécules de résazurine (molécule oxydée) et de résorufine (molécule réduite) (Fiche technique ThermoFisher Scientific, AlamarBlue™ Cell Viability Assay Reagent)	95
Figure 35 : Cinétiques d'apparition de la fluorescence (RFU) au cours du temps en fonction de la densité cellulaire pour des cultures planctoniques de <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> (Mariscal et al. 2009).....	96
Figure 36 : Courbes de calibration de quantification cellulaire des biofilms (\log_{10} d'UFC) en fonction du temps permettant d'obtenir une fluorescence à 100 000 RFU (graphiques de gauche) ou du temps nécessaire pour atteindre le maximum de fluorescence (graphiques de droite); A) Sur la souche <i>Staphylococcus aureus</i> et B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Van den Driessche et al. 2014)	99
Figure 37 : Cinétiques d'apparition de la fluorescence pour des biofilms traités à différentes concentrations de gentamycine. Δt indique la différence entre le temps nécessaire pour atteindre le point d'inflexion du biofilm traité et celui du biofilm contrôle (Dalecki et al. 2016)	100
Figure 38 : Observation en microscopie à balayage d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> formé à la surface d'un caillou, a) barre d'échelle, 10 μm . b) barre d'échelle, 1 μm (Whiteley et al. 2001)	102
Figure 39 : Composition de la matrice de <i>P. aeruginosa</i> schématisé par (Hauser and Ozer 2011)	103
Figure 40 : Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> observé en microscopie confocale à balayage laser : cellules marquées au DAPI (bleu), ePS marqués à la WGA-FITC (lectine de <i>Triticum vulgare</i> , vert), ePN marquées au SyproRUBY® (rouge) (Randrianjatovo-Gbalou 2016).....	106
Figure 41 : Arbre phylogénétique obtenu sur la base d'alignement de séquences ARN 16S de <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weisella</i> (Björkroth and Holzapfel 2006)	107

Figure 42 : Observation en microscopie à balayage de cellule de <i>L. mesenteroides</i> déposées sur membrane (Kaletunç et al. 2004)	107
Figure 43 : Morphologie des colonies d'une souche de <i>L. citreum</i> sur milieu MRS avec et sans saccharose (40 g.L ⁻¹)	108
Figure 44 : Synthèse d'homopolysaccharide à partir de saccharose (Monsan et al. 2001)	108
Figure 45 : Étapes de formation de biofilms sur membranes d'esters de celluloses.....	118
Figure 46 : Représentation schématique du FTIR-ATR, n_s correspond à l'indice de réfraction de l'échantillon, n_c l'indice de réfraction du cristal et θ l'angle d'incidence (Humbert and Quilès 2011).....	120
Figure 47 : Mode de vibration des molécules (illustré par une molécule CH ₂) (Dalibart and Servant 2000).....	121
Figure 48 : Spectre ATR-FTIR d'un culot partiellement déshydraté de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en fin de phase exponentielle de croissance (Humbert and Quilès 2011)	121
Figure 49 : Dispositif de jet de plasma froid utilisé. A) Pointe de 20 µm de rayon à l'extrémité (x 400). B) Le jet de plasma corona dans l'air ambiant. C) Visualisation du jet de plasma généré à l'obscurité. D) Schématisation du système. En rouge, pointe en tungstène. En orange, cathode cylindrique en cuivre. Abréviations : HT, alimentation haute tension. R, résistance. i, sens du courant électrique, d, distance pointe-échantillon.....	131
Figure 50 : A) Fréquence de répétition naturelle des impulsions de courant. B) Impulsions de courant enregistrées lors du traitement d'un biofilm de <i>L. citreum</i> . La puissance électrique dissipée est de l'ordre de 100 mW	132
Figure 51 : Spectres d'émission du jet de plasma corona à l'interface d'un biofilm de 24 h de <i>L. citreum</i> , A) spectre d'émission dans les UV (260 à 440 nm) : a) Second système de l'azote positif N ₂ (290 à 440 nm) et premier système de l'azote négatif N ₂ ⁺ (392 nm); b) Système OH (306 à 312 nm) ; B) Spectre d'émission dans le visible (600-900 nm) : a) Premier système positif de l'azote N ₂ (650 nm et 750 nm) ; b) et c) Oxygène atomique O (777 nm et 844 nm).....	133
Figure 52 : Spécifications des LED UV-C Crystal IS modèle Optan	134
Figure 53 : Spectre d'absorbance des rayonnements UV, réalisé au Laplace : A) LED à 260 nm ; B) LED à 280 nm.....	134
Figure 54 : Dispositif LED UV-C : A) Vue coté LED ; B) Vue d e dessus montrant le radiateur de refroidissement de la LED (partie noire) ; C) Vue d'ensemble du dispositif lors d'un traitement ; D) Schématisation du circuit d'alimentation	135

Figure 55 : Visualisation de la croissance de <i>L. citreum</i> après 24 d'incubation et un dépôt initial à différentes densités cellulaires ; A) Dépôt à une densité de 2.10^3 UFC.cm ⁻² , B) Dépôt à une densité de 2.10^4 UFC.cm ⁻² , C) Dépôt à une densité de 3.10^6 UFC.cm ⁻²	141
Figure 56 : Formation de biofilms calibrés ; A) Biofilm de 24 h de <i>L. citreum</i> formé sur milieu MRS, B) Biofilm de 24 h de <i>L. citreum</i> formé sur milieu MRS supplémenté en saccharose, C) Biofilm de 24 h de <i>P. aeruginosa</i> formé sur milieu LB	142
Figure 57 : Modalités de la formation des biofilms sur membrane d'esters de cellulose	142
Figure 58 : Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) de la répartition des cellules des biofilms de 24 h, A) Membrane stérile d'esters de cellulose, A1) vue globale (x 2920), A2) vue agrandit (x 25478) ; B) <i>P. aeruginosa</i> en milieu LB, B1) vue globale (x 9870), B2) vue agrandit (x 33199) ; C) <i>L. citreum</i> en milieu MRS, C1) vue globale (x 2920), C2) vue agrandit (x 31292) et D) <i>L. citreum</i> en milieu MRS supplémenté en saccharose, D1) vue globale (x 4753), D2) vue agrandit (x 25749)	145
Figure 59 : Spectres FTIR des biofilms et des cellules planctoniques normalisés de <i>L. citreum</i> et <i>P. aeruginosa</i> (somme des valeurs d'absorbance des spectres soit égale à 1). Spectre de la membrane d'ester de cellulose (gris), les biofilms de 24 h de <i>P. aeruginosa</i> (vert), de <i>L. citreum</i> (jaune), de <i>L. citreum</i> formé en présence de saccharose (orange) et le polymère de dextrane (rouge)	147
Figure 60 : Spectres FTIR normalisés à 1280 cm^{-1} des cellules planctoniques de <i>L. citreum</i> et des biofilms formés sur milieu MRS	148
Figure 61 : Spectres FTIR normalisés à 1280 cm^{-1} des cellules planctoniques de <i>L. citreum</i> et des biofilms formés sur milieu MRS supplémenté en saccharose	148
Figure 62 : Spectres FTIR normalisés à 1280 cm^{-1} des cellules planctoniques de <i>P. aeruginosa</i> et des biofilms formés sur milieu LB	149
Figure 63 : Image de microscopie confocale à balayage laser d'un biofilm de 24 h de <i>P. aeruginosa</i> . Les exopolysaccharides sont marqués au PAS (réactif de Schiff). Objectif 63x à immersion dans l'huile, Leica SP2 AOBS.	150
Figure 64 : Images de microscopie confocale à balayage laser du biofilm de 24 h de <i>P. aeruginosa</i> ; A) marquage des protéines via le marqueur Epicocconone (rouge), B) marquage de l'ADNe avec le marqueur TOTO-1 (vert) et C) superposition des marquages des protéines (Epicocconone, rouge) et de l'ADNe (TOTO-1, vert). Objectif 63x à immersion dans l'huile, Leica SP2 AOBS.	151

Figure 65 : Détection et dosage de l'ADN extracellulaire dans les surnageants issus des différents biofilms de 24 h (migration en gel à 1% d'agarose). Dosage de l'ADNe réalisé avec le marqueur fluorescent Picogreen ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). LQ : limite de quantification	152
Figure 66 : Amplification PCR de l'ADN extracellulaire des surnageants des différents biofilms ; A) Amplification de <i>P. aeruginosa</i> (amorces Opr1/2) (migration en gel à 1% d'agarose), B) Amplification de <i>L. citreum</i> (LcitF/R) (migration en gel à 1,5% d'agarose)	153
Figure 67 : Visualisation de l'effet du traitement avec le jet de plasma corona sur des cellules planctoniques de <i>L. citreum</i> déposées sur MRS, A) Témoin non traité B) Traitement de 10 min au jet de plasma corona.	154
Figure 68 : Test de différentes pointes de 20 μm du Jet corona par la méthode du diamètre d'inhibition sur la souche <i>L. citreum</i> (n=3). Analyse ANOVA suivie d'un test de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$)	155
Figure 69 : Efficacité biocide du jet de plasma corona sur biofilm de <i>L. citreum</i> (n=3)	156
Figure 70 : Diamètre d'inhibition de cellules planctoniques de <i>L. citreum</i> traitées avec les LED dans l'UV-C, A) Témoin non traité, B) Utilisation de la LED à 280 nm, C) Utilisation de la LED à 260 nm.....	156
Figure 71 : Diamètre d'inhibition de culture de <i>L. citreum</i> traité 10 min avec les LED à 260 et 280 nm (n=3)	157
Figure 72 : Efficacité biocide des LED UV-C sur le biofilm de <i>L. citreum</i> (n=3). Analyse ANOVA suivie d'un test de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$)	157
Figure 73 : Spectres IR des biofilms témoins et traités à la LED UV-C ; A) <i>L. citreum</i> en milieu MRS, B) <i>L. citreum</i> en milieu MRS + saccharose, C) <i>P. aeruginosa</i> sur milieu LB.....	212
Figure 74 : Schéma résumant la démarche analytique utilisant la v-qPCR pour l'étude de la viabilité cellulaire	216
Figure 75 : Amplification des souches modèles en qPCR, de l'ADN génomique, avec en a) Utilisation des amorces Opr1/2 sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442, b) Utilisation des amorces dessinées Leuco F2/R7 sur <i>L. citreum</i> B-1299	222
Figure 76 : Comparaison des différentes méthodes de lyse sur une suspension de <i>L. citreum</i> : concentration en cellule.mL ⁻¹ déterminée par dénombrement et par qPCR. Témoin et traitement thermique n=5, Traitement mécanique n=2. Test ANOVA Newman-Keuls ($P < 0,05$)	224

Figure 77 : Efficacité de lyse thermique pour une suspension de <i>P. aeruginosa</i> : La concentration est en cellules.mL ⁻¹ déterminée par dénombrement et par qPCR. Témoin et traitement thermique n=3. T-test (P< 0,05)	225
Figure 78 : Démarche expérimentale marquage EMA et PMA sur suspensions bactériennes	226
Figure 79 : Évaluation de la perméabilité cellulaire de cellules viables de <i>L. citreum</i> et <i>P. aeruginosa</i> aux marqueurs PMA et EMA après 5 min (en gris) et 1 h de mise en contact (en noir)	227
Figure 80 : Évaluation de la capacité des marqueurs à se lier à l'ADN de cellules mortes de, a) <i>L. citreum</i> avec le marqueur PMA, b) de <i>P. aeruginosa</i> avec le marqueur PMA (gris) et EMA (gris foncé) ; la ligne pointillée correspond à la limite de détection de la méthode qPCR.	228
Figure 81: Réduction de la viabilité estimée par dénombrement (symboles et traits pleins) ou essai à la résazurine (symboles ouverts et pointillés) après traitement LED UV-C de cellules déposées. A) <i>L. citreum</i> à 2 concentrations (triangles : $7,8 \pm 0,02 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$ et ronds : $8,8 \pm 0,05 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$ et B) <i>P. aeruginosa</i> . Les modèles représentés correspondent à une régression de Weibull pour <i>L. citreum</i> et une régression « linear log + tail » pour <i>P. aeruginosa</i> (n=3)	251

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fonctions des enveloppes et des appendices cellulaires bactériens (Prescott and Klein 2002; Talaro and Talaro 2002)	41
Tableau 2 : Illustration des diversités de paramètres physique et biologique lors du traitement de biofilms dans la littérature	66
Tableau 3 : Comparaison des lampes UV à vapeur de mercure et les LED UV, d'après (Chen et al. 2017)	71
Tableau 4 : Résumé des publications sur le traitement de biofilms par des LED dans les UV ..	77
Tableau 5 : Méthodes permettant d'évaluer la viabilité au sein d'un biofilm bactérien	82
Tableau 6: Conditions d'utilisation d'un essai à la résazurine pour la quantification de cellules planctoniques ou de biofilms.....	97
Tableau 7 : Composition des milieux de culture utilisés	116
Tableau 8 : Correspondance des principales bandes de vibrations dans l'infrarouge de 3 000 à 900 cm^{-1} . Légendes : ν : élongation, δ : déformation, τ : torsion, a : asymétrique et s : symétrique (Quilès et al. 2010).....	122
Tableau 9 : Caractéristiques des amorces utilisées	129
Tableau 10 : Evaluation de la biomasse et du taux d'hydratation des biofilms de 24-h.....	143
Tableau 11 : Rapport des protéines (pic amide II, 1540 cm^{-1}) sur les polysaccharides (1070 cm^{-1})	149
Tableau 12 : Rapport des pics AmII/PS (1540 cm^{-1} / 1070 cm^{-1}) pour les biofilms avant et après traitement de 20 minutes avec la LED UV-C	210
Tableau 13 : Amorces utilisées lors de cette étude	219

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNe	ADN extracellulaire
AFNOR	Association Française de NORmalisation
ANOVA	ANalysis Of VAriance (analyse de variance)
ATCC	American Type Culture Collection
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform InfraRed spectroscopy (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée)
ARN	Acide RiboNucléique
BET	Bromure d'ETHidium
CDS	Coding DNA Sequence (séquence d'ADN codante)
cg	copie génome
CFU	Colony Forming Unit
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope (microscope confocal à balayage laser)
Ct	Cycle Threshold (Cycle seuil)
Da	Dalton
DBD	Décharge à Barrière Diélectrique
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EMA	Ethidium Monon-Azide
ePN	ProtéiNes extracellulaires
ePS	exo-PolySaccharides extracellulaires
EPS	ExoPolymeric Substances (Substances Exo-Polymériques)
LAB	Lactic Acid Bacteria (bactérie lactique)
LED	Light-Emitting Diode (Diodes ElectroLuminescente)
<i>L. citreum</i>	<i>Leuconosotoc citreum</i>
LB	Luria Bertani
MDR	Multi Drug Resistance
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MRS	Man Rogosa Sharpe
NF	Norme Française

NTU	Nephelometric Turbidity Unit (Unité de Turbidité Néphélométrique)
OMVs	Outer Membrane Vesicles
PAM	Plasma Activated Medium
PAW	Plasma Activated Water
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par polymérase)
PG	PeptidoGlycane
PMA	Propidium Mono Azide
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
qPCR	PCR quantitative en temps réel
QS	quorum sensing
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
RNS	Reactive Nitrogen Species (espèces réactives de l'azote)
rpm	rotation par minute
SSB	Surface Spread Bacteria (bactérie déposée)
TBE	Tris-Borate EDTA
TS	Trypicase Soja
UFC	Unité Formant Colonie
UV-C	UltraViolet C
VBNC	Viable But Non Cultivable (bactéries viables mais non cultivables)
v-qPCR	viabilité qPCR

Introduction générale

Dans la nature, le mode de vie en biofilm est nettement majoritaire puisque l'on estime que 95 à 99% des micro-organismes sont organisés sous cette forme. Les biofilms sont une communauté de micro-organismes fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice. La matrice sécrétée est fortement hydratée et comporte un ensemble complexe de biopolymères (ou EPS pour *Extracellular Polymeric Substances*) : polysaccharides, protéines, ADN extracellulaire et lipides. Les biofilms correspondent à une structure tridimensionnelle complexe qui permet aux bactéries une tolérance accrue à de nombreux stress environnementaux. Les biofilms jouent un rôle primordial dans différents écosystèmes naturels (cycle de la matière) et peuvent être utilisés pour différentes applications technologiques telles que les traitements épuratifs de l'eau. Cependant, les biofilms sont essentiellement connus pour leurs effets négatifs, notamment dans le domaine médical (infections nosocomiales) mais aussi dans le domaine industriel (perte de rendement énergétique et biodétériorations des équipements). Ainsi, du fait de leur importance sanitaire et économique, ils font l'objet d'une véritable « lutte anti-biofilms » et ils sont de plus en plus étudiés de façon à limiter leurs effets. L'existence de caractéristiques phénotypiques particulières pour les bactéries au sein d'un biofilm et la présence d'une matrice offrant une protection physique et chimique aux cellules les rendent très résistantes aux traitements conventionnels (antibiotiques, agents d'oxydation). Dans le domaine médical par exemple, les cellules qui composent le biofilm sont connues pour être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que les cellules en état planctonique. Dans le domaine industriel, l'inactivation des biofilms bactériens passe traditionnellement par des traitements chimiques ou thermiques, qui posent des problèmes de résidus toxiques, de coût énergétique et/ou d'utilisation de grandes quantités d'eau.

De nouvelles stratégies, innovantes et à faible impact environnemental, sont à l'étude depuis quelques années pour limiter l'incidence des biofilms bactériens. Ces méthodes peuvent être utilisées en prévention de la formation des biofilms (traitement de surface par exemple) ou dans un but curatif sur des biofilms établis. Dans ce dernier cas, différentes méthodes peuvent être employées : des méthodes biologiques (utilisation d'enzymes, de bactériophages ou d'inhibiteurs de la communication cellulaire), ou des méthodes physiques telles que les diodes électroluminescentes émettant des ultraviolets et les plasmas froids à la pression atmosphérique.

Cette thèse de doctorat s'inscrit dans la problématique de l'évaluation de l'efficacité anti-biofilms bactériens de ces deux types de traitements physiques émergents.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE, EA 4565) de l'Université Paul Sabatier sur le site d'Auch de l'IUT 'A'. Le laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à l'étude structurale et fonctionnelle de biofilms microbiens et autres agrégats bactériens. Une collaboration a ainsi été initiée avec l'équipe PRHE (Plasmas Réactifs Hors Equilibre) du laboratoire Laplace de l'Université Paul Sabatier de Toulouse. Les premières études ont permis d'observer les effets biocides d'un réacteur de jet de plasma froid à la pression atmosphérique sur des biofilms de bactérie lactique *Weissella confusa* (Marchal et al. 2012). Depuis, l'équipe PRHE a développé un nouveau prototype sur un schéma similaire. Par ailleurs, les ultraviolets sont classiquement utilisés pour la décontamination/stérilisation de surfaces, et dans ce domaine, la technologie LED UV-C émerge depuis 2014 en vue de remplacer les lampes germicides à vapeur de mercure. Ainsi, l'objectif principal de ces travaux est d'évaluer l'efficacité biocide de ces deux types de traitement physique sur des biofilms bactériens modèles, en accordant un intérêt particulier à l'implication des composantes matricielle et cellulaire des biofilms.

La première partie de cette thèse apporte des **éléments bibliographiques** permettant de situer le contexte scientifique de l'étude. Après une description générale des biofilms bactériens et de leurs caractéristiques sur le plan matriciel et cellulaire, les technologies plasma froid à la pression atmosphérique et LED UV-C sont présentées, de même qu'un état des lieux de leur utilisation pour l'inactivation de biofilms bactériens mono-espèces. Puis, les différentes méthodes analytiques utilisées pour évaluer en laboratoire l'effet anti-biofilm de différents traitements biocides sont introduites, et les méthodes d'étude de la viabilité cellulaire, qui ont fait l'objet d'un développement expérimental lors de cette étude, sont détaillées. Cet état de l'art se termine par une description des caractéristiques des deux espèces et souches bactériennes utilisées au cours de cette étude.

Après une description des principaux **objectifs des travaux de thèse**, les résultats obtenus sont regroupés dans une seconde partie débutant par un **Matériels et méthodes** général suivi de quatre chapitres pouvant comporter des résultats sous forme d'articles scientifiques en anglais. Dans ce cas, l'article est précédé d'une présentation synthétique des résultats ainsi que d'une discussion en français. Le **chapitre I** est consacré à la méthodologie de formation de biofilms aériens standardisés et reproductibles, produits sur membrane de filtration. Il comporte également la description des deux systèmes physiques de traitement des biofilms et de leurs

conditions d'utilisation. Le **chapitre II** présente les résultats de traitement des biofilms bactériens modèles avec le dispositif jet de plasma froid et leur comparaison avec l'effet sur des cellules 'simplement' déposées sur le support. Les effets du dispositif LED UV-C, étudiés de façon similaire, sont présentés dans le **chapitre III**. Le **chapitre IV** est dédié à la mise au point d'une méthode d'étude de la viabilité cellulaire applicable à des biofilms. Deux méthodes ont été évaluées, la méthode moléculaire de viabilité qPCR (ou PMA/EMA qPCR) et la méthode métabolique utilisant la résazurine. Enfin, une dernière partie '**Conclusion générale et perspectives**' termine ce manuscrit.

Partie 1-Revue bibliographique

1 Description des biofilms bactériens

1.1 Les biofilms

1.1.1 Définition

Le concept de biofilms a été proposé, en 1978, par Costerton et ses collaborateurs, et défini comme une communauté de microorganismes enchâssés dans une matrice et adhérents à une surface (Costerton et al. 1978; Costerton 1995). Cette matrice extracellulaire est fortement hydratée (jusqu'à 97% d'eau) et comprend un ensemble de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaires, regroupés sous le terme de substances polymériques extracellulaires (SEP ou *EPS*, *Extracellular Polymeric Substances*) (Sutherland 2001; Branda et al. 2005; Flemming and Wingender 2010). D'après Flemming et Wingender (2010) les cellules bactériennes représentent environ 10% de la masse sèche d'un biofilm, le reste correspondant à la matrice extracellulaire (Flemming and Wingender 2010). De façon plus large, le terme biofilm est également utilisé pour décrire les structures qui se forment à des interfaces liquide-air, on parle alors de pellicules, ou en milieu liquide, parlant alors de flocons ou granules (Flemming et al. 2016).

Les micro-organismes qui composent le biofilm peuvent être très divers : bactéries, champignons microscopiques, algues ou protozoaires (Figure 1). De plus, un biofilm peut être formé d'un seul type de micro-organismes ou de plusieurs, ce dernier cas étant largement le plus fréquent dans les écosystèmes naturels (Wingender et al. 1999). Dans la nature, le mode de vie en biofilm est nettement majoritaire puisqu'on estime que de 95 à 99% des micro-organismes sont organisés sous cette forme (Nikolaev and Plakunov 2007).

Les biofilms sont ubiquitaires ; ils peuvent se développer sur n'importe quel type de surface biotique ou abiotique (Dunne and Dunne 2002). Ils sont ainsi retrouvés dans de nombreux écosystèmes naturels (eaux de rivières, racines des plantes, peau, tractus intestinal ...), dans le domaine industriel (canalisations, systèmes de filtration) ainsi que dans le domaine médical (plaies chroniques, prothèses, cathéters, sondes urinaires...). Ces deux derniers domaines sont concernés par le développement de biofilms dits indésirables (biofilms négatifs) entraînant des sérieux problèmes économiques et de santé publique. Ainsi, dans le domaine médical, des études estiment que 65% des infections bactériennes impliquent des biofilms (Lewis 2008). Ces infections peuvent notamment être liées à l'implantation de dispositifs médicaux tels que les cathéters vasculaires, les sondes des voies urinaires, les valves cardiaques ou les prothèses orthopédiques (Donlan 2001; Lebeaux et al. 2014; Römling et al. 2014) (Figure 1). Dans le

secteur agroalimentaire, la présence de biofilms est à l'origine de la persistance de bactéries pathogènes dans les environnements industriels pendant de longues périodes, pouvant être à l'origine de sources de (re)contamination des aliments. Des études estiment que 60% des infections alimentaires sont liées à des contaminations croisées dues à un transfert de micro-organismes adhérents sur des surfaces ou des équipements (Bridier et al. 2015). En plus des problèmes sanitaires, ces contaminations peuvent entraîner des modifications des qualités organoleptiques ou de la durée de conservation des produits finis (Van Houdt and Michiels 2010).

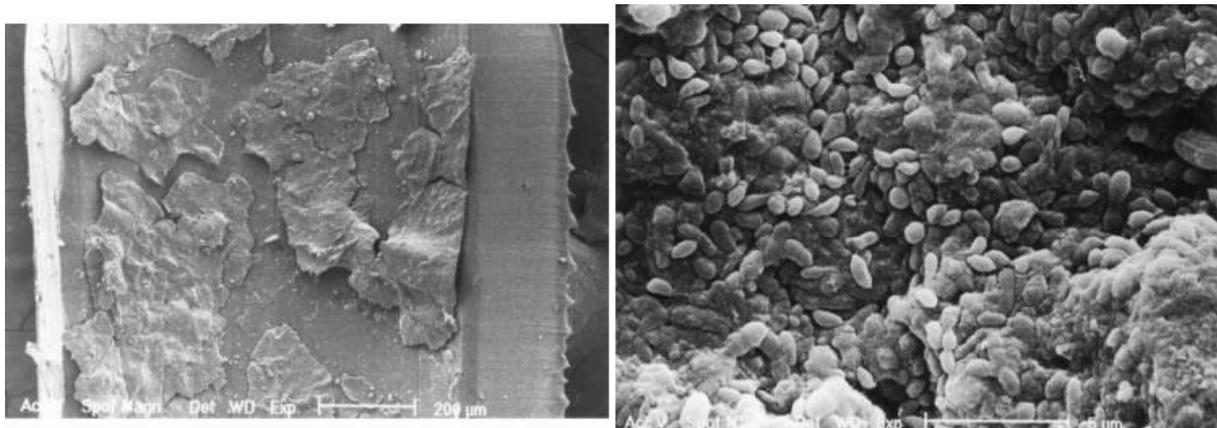


Figure 1: Observation en microscopie à balayage d'un biofilm formé à l'interface air-liquide dans un endoscope (Pajkos et al. 2004), A) la barre représente 200 µm et B) la barre représente 5 µm

1.1.2 Formation des biofilms

Le processus de formation des biofilms est un processus complexe qui dépend de nombreux facteurs environnementaux (disponibilité en nutriments, teneur en oxygène, pH) ainsi que des propriétés intrinsèques des micro-organismes (Nikolaev and Plakunov 2007). De plus, les propriétés des surfaces (topographie, composition chimique, charge et hydrophobicité) influent sur les capacités d'adhésion bactérienne (Song et al. 2015). Bien que les mécanismes mis en jeu lors du passage des bactéries de la forme planctonique (libre en solution) à la forme sessile (attachée à une surface) varient en fonction des espèces et des conditions environnementales, les biofilms partagent tous les mêmes étapes de développement, illustrées dans la Figure 2 et détaillées ci-après (Nikolaev and Plakunov 2007; Flemming 2014; Gupta et al. 2016).

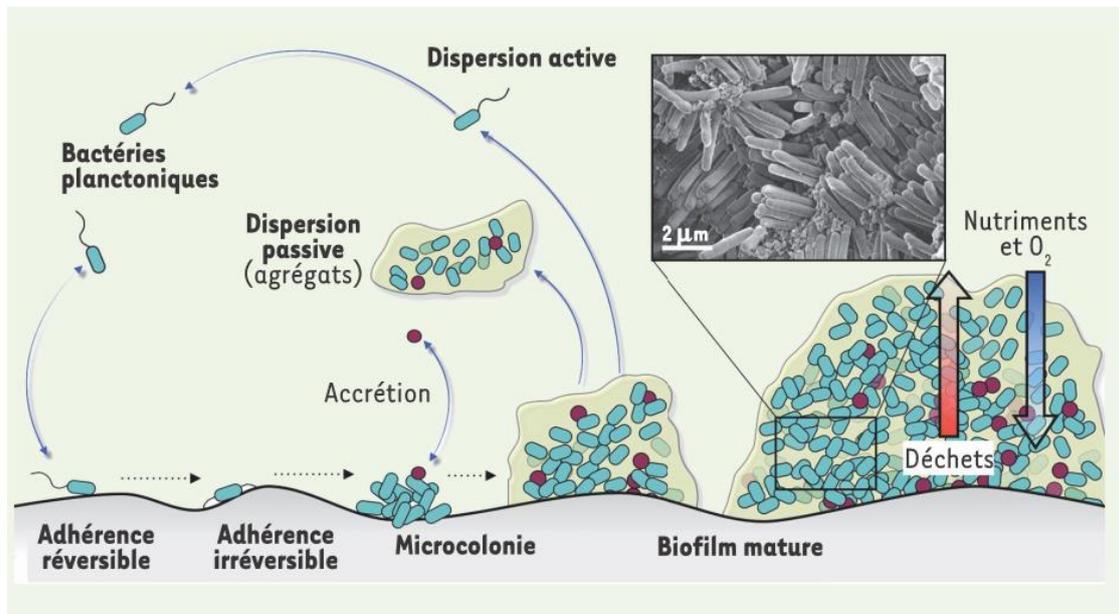


Figure 2 : Étapes de formation des biofilms (Lebeaux and Ghigo 2012)

- Transport des bactéries et film conditionnant

Dans les conditions naturelles, les surfaces immergées sont recouvertes de molécules organiques (protéines, glucides, lipides...) formant un film appelé **film conditionnant ou primaire**. Selon les propriétés chimiques et physiques du support, ce film primaire change les propriétés de la surface, favorisant plus ou moins l'adhésion bactérienne (Flemming 2014). Les molécules adsorbées représentent également une source de nutriment pour les bactéries, favorisant ainsi leur transfert vers la surface par chimiotactisme.

L'approche des bactéries vers la surface à coloniser peut-être active ou passive. Dans le cas des bactéries mobiles, le déplacement vers la surface à coloniser se fait par un mécanisme actif dû à la présence de flagelles. Le transport passif quant à lui dépend du milieu environnant (viscosité par exemple) et des mouvements de ce dernier (écoulement, sédimentation, ...) (Song et al. 2015).

- Adhésion sur le support

Lorsque les conditions sont favorables, les cellules en état planctonique se fixent à la surface. Cette adhésion est dans un premier temps réversible, de faibles forces mécaniques peuvent détacher les bactéries. Les liaisons mises en jeu sont des liaisons faibles de type van der Waals, stériques ou électrostatiques (Dunne and Dunne 2002). Les appendices cellulaires tels que les pili et les flagelles contribuent également à cette adhésion cellulaire (Persat et al. 2015). L'adhésion devient ensuite irréversible, lorsque les forces d'attraction sont plus fortes que

celles de répulsion. Dans cette étape, les cellules perdent leur capacité de mouvement, adhèrent entre elles, et commencent à sécréter des EPS (Nikolaev and Plakunov 2007).

- Développement du biofilm

Une fois que les bactéries ont adhéré au support, elles vont se multiplier activement afin de former un biofilm mature. L'augmentation de la biomasse cellulaire et l'agrégation des cellules entre elles conduisent à la formation de microcolonies. Ces changements induisent l'expression de gènes spécifiques, avec notamment une sécrétion abondante d'EPS pour former la matrice extracellulaire (Gupta et al. 2016). Les interactions entre les exopolymères, entre les cellules et entre les cellules et les EPS permettent de maintenir la cohésion de l'ensemble. Les bactéries coordonnent leur comportement cellulaire grâce à l'émission et la réception de signaux extracellulaires en fonction de leur densité (mécanisme du quorum sensing, QS) et de la perception de paramètres environnementaux (Papenfort and Bassler 2016). De plus, le second messager intracellulaire, di-GMP cyclique (di-guanosine monophosphate cyclique) joue un rôle central pour le passage en mode de vie biofilm (Maunder and Welch 2017).

La formation de cavités et de canaux permet le transport des substances nutritives, de l'eau, des signaux de communication cellulaire et de l'oxygène à travers la structure du biofilm. Ces canaux jouent également un rôle dans l'élimination des sous-produits du métabolisme dont l'accumulation pourrait être nocive pour les bactéries (Donlan 2002; Allison 2003). La structure s'épaissit au fur et à mesure, et peut atteindre une épaisseur de plusieurs centaines de μm (Gupta et al. 2016). Des structures spécifiques se forment parfois, comme, par exemple, des formes en champignons (*mushroom*) dans le cas de certaines souches de *P. aeruginosa* (Ghafoor et al. 2011).

Un biofilm a donc une organisation spatiale tridimensionnelle, permettant des échanges (information génétique, nutriments) et une coopération entre les micro-organismes présents. La capacité des bactéries à croître reste limitée par la disponibilité et la diffusion des nutriments et de l'oxygène à travers la matrice extracellulaire.

- Détachement et dispersion des bactéries

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, un détachement passif peut survenir par des phénomènes d'érosion (Coughlan et al. 2016). La dispersion peut aussi être active, sous le contrôle du quorum sensing. Des modifications génétiques sont induites, entraînant le retour à la forme planctonique, avec expression des appendices moteurs, flagelles

et pili (McDougald et al. 2012; Solano et al. 2014). La sécrétion d'enzymes lytiques qui dégradent les constituants de la matrice (protéases, DNases) contribuent à faciliter cette dissémination par déstructuration des composés cohésifs de la matrice. Les cellules planctoniques et/ou des agrégats libérés du biofilm peuvent ensuite coloniser de nouvelles surfaces.

1.2 Composante matricielle des biofilms

La matrice du biofilm est un système complexe et dynamique dans le temps et l'espace qui représente de 50% à 90% de la masse organique carbonée du biofilm. Cette matrice est fortement hydratée et peut contenir jusqu'à 97% d'eau. En plus de l'eau, la matrice est constituée d'une association complexe de molécules sécrétées, les EPS, mais aussi de nutriments, de métabolites, de produits de lyse cellulaire et d'autres éléments du milieu environnant (Allison 2003; Coughlan et al. 2016).

Les EPS sécrétées par les cellules bactériennes ont un rôle essentiel dans la formation et l'architecture du biofilm. Ces EPS peuvent être de différentes natures : des protéines extracellulaires (ePN), des exopolysaccharides (ePS), de l'ADN extracellulaire (eDNA) ainsi que des lipides (Branda et al. 2005). La nature des EPS peut considérablement varier selon les micro-organismes et l'environnement dans lequel se trouve le biofilm. De plus, bien que de nombreuses études lui soient consacrées, la matrice est encore parfois nommée la « matière noire » du biofilm (Flemming and Wingender 2010), du fait de la très grande variété de polymères qui la constituent ainsi que des difficultés expérimentales pour leur extraction et leur analyse.

Les composés matriciels sont impliqués dans l'adhésion des cellules aux supports et dans l'agrégation des cellules entre elles. Les EPS garantissent la cohésion du biofilm ainsi que son architecture (Flemming and Wingender 2010). Une autre fonction clef de la matrice est son rôle de barrière protectrice. Elle permet aux cellules de survivre en milieu hostile (dessiccation ou carence en nutriments par exemple) ou lors de traitements antimicrobiens (antibiotiques, radiations UV) (Flemming and Wingender 2010). Les composés matriciels ont également un rôle primordial dans le maintien des conditions d'hydratation (rétention d'eau) et de l'apport en nutriments.

Les paragraphes suivants détaillent quelques composés matriciels majeurs en s'attachant plus particulièrement aux bactéries étudiées lors de ces travaux.

1.2.1 Exopolysaccharides

La capacité de synthétiser des exopolysaccharides (ePS) est répandue chez la plupart des bactéries, et ces ePS peuvent représenter 2 à 5% du poids humide de la matrice (Sutherland 2001). Il existe une très grande diversité structurale, avec des différences entre genres, espèces et même souches bactériennes. Ils sont impliqués dans des fonctions de protection, en permettant la persistance lors de conditions environnementales défavorables (résistance à la dessiccation). Par exemple, ces ePS ont un rôle fondamental dans la résistance cellulaire des bactéries au système immunitaire de l'hôte (résistance à la phagocytose). De plus, les polysaccharides agrégatifs jouent un rôle essentiel dans l'adhésion aux surfaces et dans les interactions inter-molécules et intercellulaires au sein du biofilm (Limoli et al. 2015).

Dans le cas de l'espèce *P. aeruginosa*, l'**alginate** est décrit comme le polysaccharide prédominant pour les souches présentant un phénotype mucoïde. Ce phénotype est essentiellement retrouvé chez les isolats de patients atteints de mucoviscidose et présentant des infections respiratoires (Limoli et al. 2015; Rasamiravaka et al. 2015). L'alginate est un polymère de haut poids moléculaire (10^4 à 10^6 Da), constitué d'un enchainement non régulier de deux résidus d'acides uroniques, l'acide β -D-mannuronique (M) et de son épimère en C5 l'acide α -L-guluronique (G), liés en β -(1,4) (Figure 4a) (Ryder et al. 2007; Lembre et al. 2012). La nature anionique de cet hétéropolymère lui confère la capacité de chélater les cations, préférentiellement les ions Ca^{2+} , et de former des gels (Lembre et al. 2012).

Différentes études ont montré que ce polymère intervient dans l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Ryder et al. 2007; Ghafoor et al. 2011; Limoli et al. 2015), la rétention d'eau et celle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mann and Wozniak 2012; Limoli et al. 2015). Dans le cas des souches non mucoïdes de *P. aeruginosa* (isolats environnementaux), les principaux exopolysaccharides sont le Pel et le Psl. Leur surproduction entraîne la formation de colonies rugueuses/ridées (Figure 3) (Mann and Wozniak 2012; Limoli et al. 2015).

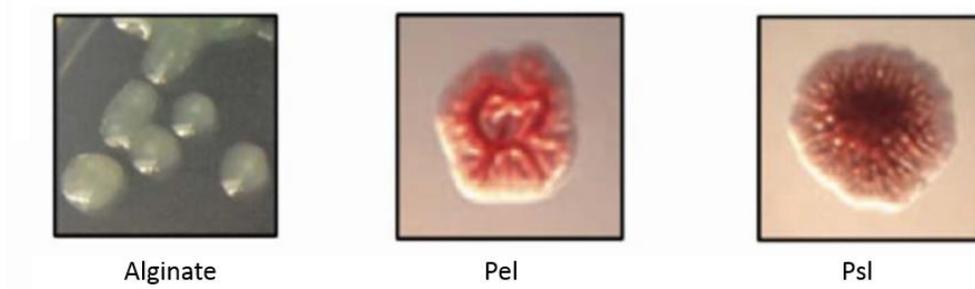


Figure 3 : Phénotypes des colonies de *P. aeruginosa* dû à la surexpression d'ePS, A) souche de *P. aeruginosa* (mucA22), B) souche de *P. aeruginosa* (Δ wspF Δ pel) et C) souche de *P. aeruginosa* (Δ wspF Δ psl) (Limoli et al. 2015)

Le **Psl** (pour *polysaccharide synthesis locus*) est un hétéropolymère composé de D-mannose, D-glucose, L-rhamnose en quantité 3:1:1 respectivement (Figure 4b) (Limoli et al. 2015). Le Psl forme des structures fibreuses disposées en hélice autour des bactéries, créant une structure en forme de maille à laquelle les cellules voisines peuvent se lier (Maunder and Welch 2017). Il intervient de façon privilégiée dans les interactions cellules-cellules et cellules-surfaces (Lembre et al. 2012; Wei and Ma 2013; Limoli et al. 2015). Le Psl est également important pour la résistance et la structure du biofilm (Mann and Wozniak 2012; Limoli et al. 2015) : Psl, en conjonction avec le Pel agit comme un échafaudage pour attacher ensemble les cellules voisines.

Le **Pel**, dont la nature chimique n'est pas clairement établie, joue également un rôle important dans l'agrégation cellulaire, l'architecture du biofilm (notamment de par son interaction avec l'ADNe) et la résistance aux antibiotiques (Wei and Ma 2013). Il est nommé Pel pour « PELlicule » car il intervient dans la formation de pellicules à l'interface air-liquide (Wei and Ma 2013; Meliani and Bensoltane 2015; Lee and Yoon 2017). Décrit initialement comme riche en glucose (Meliani and Bensoltane 2015), d'autres études ont montré que le Pel est un exopolysaccharide chargé positivement composé de glucosamine et galactosamine en partie N-acétylés reliés par des liaisons 1-4 (Jennings et al. 2015).

Pour de nombreuses autres bactéries, les ePS sont surtout des homopolysaccharides. On peut citer le poly-N-acétylglucosamine (PNAG), également appelé polysaccharide d'adhésion intracellulaire (PIA), retrouvé dans les biofilms de *Staphylococcus aureus* et de *Staphylococcus epidermidis* (Figure 4c). Le PIA est un homopolymère linéaire composé de résidus de N-acétyl glucosamine reliés par des liaisons β -1,6 et contenant une forte proportion de groupements

acétate et en plus faible quantité de groupements succinate et phosphate. Ce polymère chargé interagit avec d'autres EPS, renforçant ainsi la structure/cohésion du biofilm. De même, la cellulose, polymère linéaire constitué de résidus glucose reliés par des liaisons β -1,4, est l'un des constituants majeurs des biofilms de *Salmonella enterica* et d'*Escherichia coli* (Figure 4e). Enfin, des β -glucanes ont été mis en évidence dans la matrice de certains biofilms de *P. aeruginosa* et d'*Haemophilus influenzae* (Limoli et al. 2015; Domenech et al. 2016).

L'ensemble des EPS évoqués ci-dessus sont synthétisés au niveau intracellulaire puis exportés au niveau extracellulaire. Cette synthèse et translocation est complexe et fait intervenir un grand nombre de gènes. Par exemple chez *P. aeruginosa*, plus de 20 gènes sont impliqués dans la synthèse et la sécrétion de l'alginate et un opéron de 15 gènes est nécessaire pour la production de Psl (Lembre et al. 2012; Limoli et al. 2015).

Certaines bactéries en revanche produisent des homopolysaccharides extracellulaires dont la synthèse est assurée par une unique glycosyl-transférase extracellulaire à partir du seul saccharose. Il s'agit de fructanes (polymères de fructose de 10^4 à 10^7 Da) et d' α -glucanes (polymères de glucose de 10^4 à 10^9 Da), synthétisés respectivement par des fructane-saccharases et des glucane-saccharases (Monsan et al. 2001; Ruas-Madiedo et al. 2002; Limoli et al. 2015). Cette production entraîne parallèlement la libération respectivement de glucose ou de fructose en grande quantité, utilisable par le métabolisme bactérien. Ceci est particulièrement bien documenté dans le cas des bactéries lactiques. Ainsi, les souches de *Streptococcus mutans* et *Streptococcus salivarius*, synthétisant des fructanes (levanes) et des α -glucanes (dextranes et mutanes) à partir du saccharose, jouent un rôle majeur dans les phénomènes d'agrégation cellulaire et la formation des biofilms insolubles qui constituent la plaque dentaire (Figure 4f) (Flemming and Wingender 2010). La capacité de formation de biofilms par *Leuconostoc mesenteroides* dépend également de la production de dextranes (Badel et al. 2008) (voir p.108).

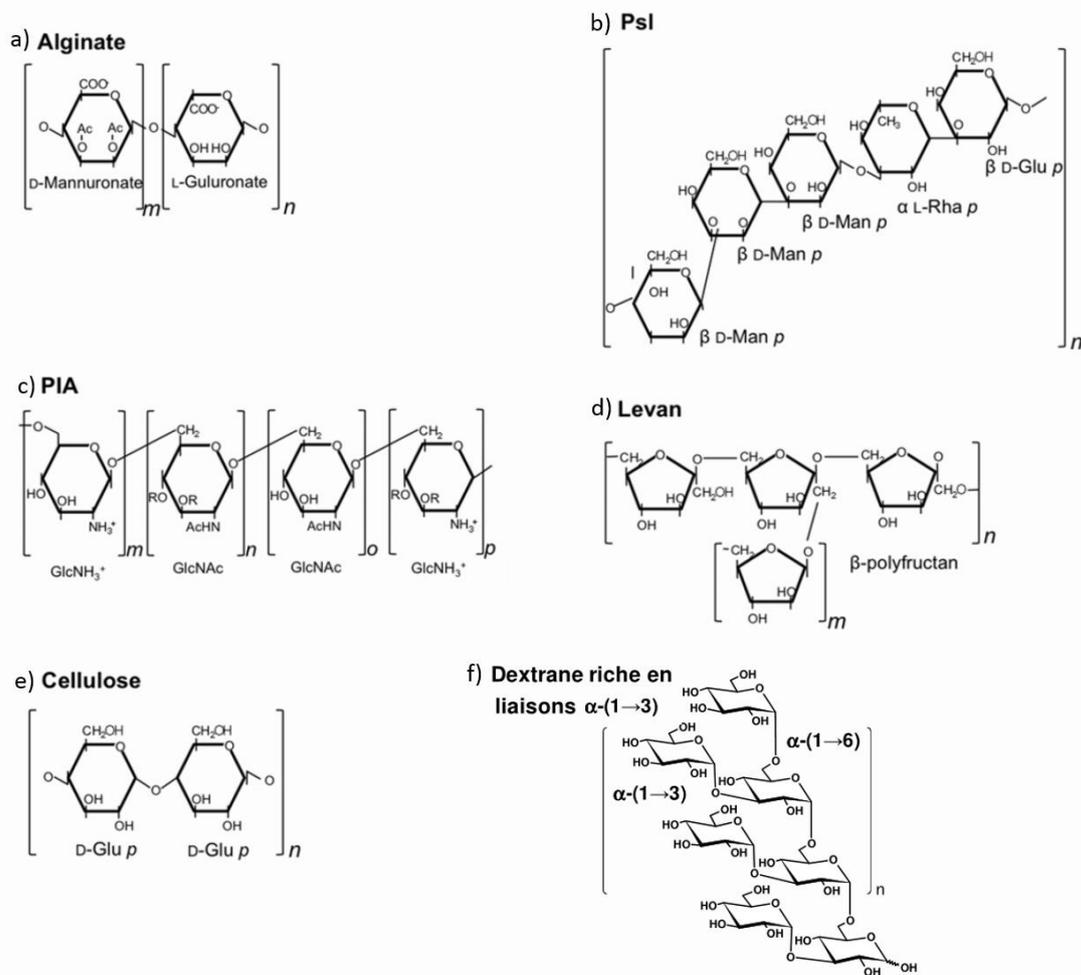


Figure 4 : Structure chimique de différents polysaccharides; a) alginate, b) Psl, c) PIA ou polysaccharide d'adhésion intracellulaire, d) levane, e) cellulose et f) dextrane branchée en α -(1 \rightarrow 3) (Bounaix 2010; Limoli et al. 2015)

1.2.2 Exoprotéines

Les protéines extracellulaires (ePN) peuvent dans certains cas constituer les composés les plus abondants dans la matrice de biofilms et font l'objet d'un nombre d'études grandissant. Elles interviennent dans différents aspects de la formation et du développement du biofilm, à la fois sur le plan structural et fonctionnel (Flemming and Wingender 2010).

On trouve parmi les ePN des **enzymes** dont beaucoup sont impliquées dans la dégradation des différents composés matriciels. Cette hydrolyse des polymères par des protéases, glycosidases et DNases permet de fournir aux bactéries les différents éléments nutritifs. D'autre part, la dégradation des EPS structuraux facilite la (ré)organisation de la matrice ainsi que le processus de détachement et de dissémination du biofilm et des cellules (Wingender et al. 1999). Par

exemple chez les souches mucoïdes de *P. aeruginosa*, l'alginate lyase, hydrolysant l'alginate, est surexprimée lors d'une carence en nutriments.

A *contrario*, des enzymes extracellulaires de synthèse peuvent être présentes dans la matrice. C'est le cas par exemple des glucane- et fructane-saccharases comme nous l'avons vu précédemment.

D'autres protéines matricielles jouent un rôle structural dans le biofilm. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, trois protéines extracellulaires de ce type ont été décrites : **LecA**, **LecB** et **CdrA**. Les lectines LecA et LecB (cytotoxiques), interviennent dans l'adhésion cellulaire et dans la formation du biofilm et sont toutes deux régulées par des éléments du quorum sensing (Diggle et al. 2006). LecA se lie préférentiellement aux résidus galactose et joue le rôle d'adhésine lors de la phase de développement du biofilm. LecB montre une affinité préférentielle pour le L-fucose (Fong and Yildiz 2015). La protéine CdrA est une adhésine qui interagit avec le polysaccharide Pel (reconnaissance des résidus mannose), comme cela a pu être démontré par des expériences de co-immunoprécipitation. Ces trois ePN sont impliqués dans l'auto-agrégation des cellules en augmentant ainsi la stabilité du biofilm (Wei and Ma 2013; Fong and Yildiz 2015; Lee and Yoon 2017). Par ailleurs, il a été montré que certaines protéines de la matrice (entre 20 à 30% chez *Pseudomonas aeruginosa*) sont associées à des vésicules de la membrane externe (OMV, *Outer Membrane Vesicles*) (Toyofuku et al. 2012; Couto et al. 2015). Ces OMV sont des vésicules sphériques composées de bicouches phospholipidiques de 20 à 200 nm sécrétées dans l'environnement par différentes souches, qui pourraient intervenir dans la structure du biofilm en interagissant avec différents EPS, dont l'ADN extracellulaire (Fong and Yildiz 2015).

Parmi les composants protéiques de la matrice impliqués dans la stabilité structurale des biofilms, on peut également évoquer les **fibres amyloïdes**. (Taglialegna et al. 2016; Randrianjatovo-Gbalou et al. 2017). Il s'agit de complexes protéiques organisés par un empilement stable et régulier de feuillets β , formant une succession de fibrilles. Parmi ces protéines amyloïdes, on peut citer TasA de *Bacillus subtilis* (Hobley et al. 2015) et FapC mise en évidence chez différentes espèces de *Pseudomonas* (Taglialegna et al. 2016).

1.2.3 ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) est retrouvé dans la matrice de biofilms de différentes origines et sa proportion parmi les autres polymères matriciels peut varier d'une espèce bactérienne à l'autre. Par exemple, des traitements à la DNase I ont permis de montrer que les biofilms de *Pseudomonas* possédaient des quantités importantes d'ADNe, essentielles à l'intégrité du biofilm (Whitchurch et al. 2002).

L'origine de cet ADNe a été attribuée à un relargage d'ADN génomique lors de la lyse cellulaire (contrôlée par le quorum-sensing) mais aussi à un phénomène actif de libération à partir d'une sous-population bactérienne (Jakubovics et al. 2013; Okshevsky and Meyer 2015).

L'ADNe joue différents rôles dans les biofilms. L'ADN, chargé négativement, assure la formation d'un échafaudage structurant au sein du biofilm par interactions avec des composés électro-négatifs. Il interviendrait particulièrement dans le cas de biofilms jeunes (Mann and Wozniak 2012). En effet, l'enzyme DNase peut déstabiliser un biofilm jeune alors qu'un biofilm plus âgé est plus tolérant à son action (Whitchurch et al. 2002; Klausen et al. 2006). Par ailleurs, certaines bactéries ont la capacité d'assimiler l'ADN libéré, et d'acquérir ainsi de nouvelles informations génétiques et dans certains cas des gènes de résistance (Jakubovics et al. 2013; Okshevsky et al. 2015).

Pour conclure, la matrice extracellulaire est une structure particulièrement complexe et elle renferme une grande diversité de molécules sécrétées. De plus, la machinerie cellulaire entière est potentiellement présente dans la matrice d'un biofilm, de fait de la présence de cellules lysées. Ces débris cellulaires, en particulier les membranes, parois, ainsi que l'ADN et l'ARN peuvent jouer également un rôle important dans le contenu de la matrice (Toyofuku et al. 2012; Couto et al. 2015).

1.3 Composante cellulaire des biofilms

Nous aborderons dans cette partie les différentes structures de l'enveloppe bactérienne ainsi que certaines des caractéristiques de développement des cellules bactériennes organisées en biofilm.

1.3.1 Structure de l'enveloppe bactérienne

Les enveloppes bactériennes en interface directe avec l'environnement matriciel jouent un rôle non négligeable dans la formation et les caractéristiques des biofilms bactériens, et sont parfois considérées comme des éléments de la matrice extracellulaire elle-même. Il s'agit notamment des protéines des appendices cellulaires (flagelles, fimbriae, pili) et des protéines de la famille Bap (biofilm associated protein) ancrées dans la paroi ou la membrane externe bactérienne dont la majeure partie est en interaction avec l'environnement extérieur. Ces protéines sont également impliquées dans l'adhésion aux surfaces et la formation des biofilms.

Les principaux constituants de l'enveloppe bactérienne sont la paroi et un ensemble de structures cellulaires, appelées parfois 'structures inconstantes,' et dont le rôle est résumé dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Fonctions des enveloppes et des appendices cellulaires bactériens (Prescott and Klein 2002; Talaro and Talaro 2002)

Structures	Composition chimique	Fonctions
Flagelles	Protéines	Mobilité
Pili et Fimbriae	Protéines	Adhésion et conjugaison bactérienne
Capsule et couche mucoïde	Polysaccharides (parfois glycoprotéines et polypeptides)	Résistance à la phagocytose, dessiccation et adhésion cellulaire
Paroi	Peptidoglycane : Gram⁺ : acides teichoïques et lipoteichoïques Gram⁻ : LPS, phospholipides, protéines	Forme de la bactérie et résistance au stress osmotique, cohésion et charge négative de surface liaison à la couche externe, protection envers les conditions environnementales défavorables, pathogénicité
Membrane cytoplasmique	Phospholipides, protéines	Contrôle des flux de nutriments et des déchets

Flagelles : De nombreuses bactéries (surtout Gram-) sont mobiles du fait de la présence d'un ou plusieurs flagelles. Ce sont des appendices filamenteux longs de 6 à 15 µm sur 12 à 30 nanomètres d'épaisseur qui permettent aux bactéries de se déplacer en milieu liquide ou semi-solide. Ils sont composés de protéines (flagellines) et ancrés dans le cytoplasme bactérien par une structure complexe. Les flagelles ont surtout un rôle dans la phase initiale de formation du biofilm.

Fimbriae et Pili : Il s'agit de structures fibrillaires et rigides, de nature protéique plus fine que les flagelles. Ils sont présents en grand nombre tout autour de la surface bactérienne et sont impliqués dans l'attachement des bactéries aux surfaces et aux autres cellules.

Certains pili (pili sexuels) sont impliqués dans le phénomène de conjugaison bactérienne. D'autres en revanche, les pili de type IV, interviennent dans l'adhésion aux surfaces et sont impliqués chez *P. aeruginosa* dans un type particulier de mobilité, appelé '*tchiwing mobility*'. Ils permettent plus particulièrement des mouvements à l'interface de surfaces-solides, par des phénomènes de rétraction de ces pili. Des fimbriae particuliers formés de protéines amyloïdes, appelés curli, sont produits chez *E. coli* et *Salmonella spp* et interviennent également dans la formation des biofilms. Ce type d'appendices extracellulaires, les Cup fimbriae, semblent être également présents chez *P. aeruginosa*.

Capsule et couche mucoïde : Ces éléments superficiels sont généralement constitués de polysaccharides de taille variables. Chez certaines bactéries (exemple *Bacillus*), la capsule est cependant composée de glycoprotéines et de polypeptides.

Les polysaccharides capsulaires (CPS) sont plus fortement en interaction avec la cellule bactérienne que les ePS. En effet, après une étape de centrifugation, les CPS sont retrouvés dans la fraction du culot bactérien alors que les ePS sont présents dans le surnageant. Cependant, cette distinction est parfois délicate (Ruas-madiedo et al. 2009). Cet ensemble de polymères constitue une couche visqueuse fortement hydratée entourant la bactérie. Elle est impliquée dans l'attachement des bactéries aux surfaces et a également un rôle de protection. Les termes de glycocalyx ou *slime* sont parfois également utilisés.

Paroi : La paroi bactérienne est une enveloppe complexe qui donne leur forme et une certaine rigidité aux cellules. Elle sert également de protection contre de la pression osmotique, assure un passage sélectif des substances nutritives. Un des constituants majeurs de la paroi

bactérienne est le peptidoglycane (PG), ou muréine. Il s'agit d'un réseau macromoléculaire constitué de chaînes glucidiques alternant N-acétylglucosamine (NAG) et acide acétylmuramique (NAM) reliés par des liaisons osidiques β -(1,4) et comportant des chaînes latérales peptidiques (au minimum tetrapeptidique) fixées sur les résidus NAM (Prescott and Klein 2002). La réticulation entre les chaînes osidiques est assurée par des ponts peptidiques entre les oligopeptides.

Les caractéristiques structurales de la paroi, mises en évidence par la coloration de Gram, permettent de définir deux types de bactéries : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, en fonction de leur richesse en composés lipidiques (Figure 5) (Prescott and Klein 2002; Talaro and Talaro 2002).

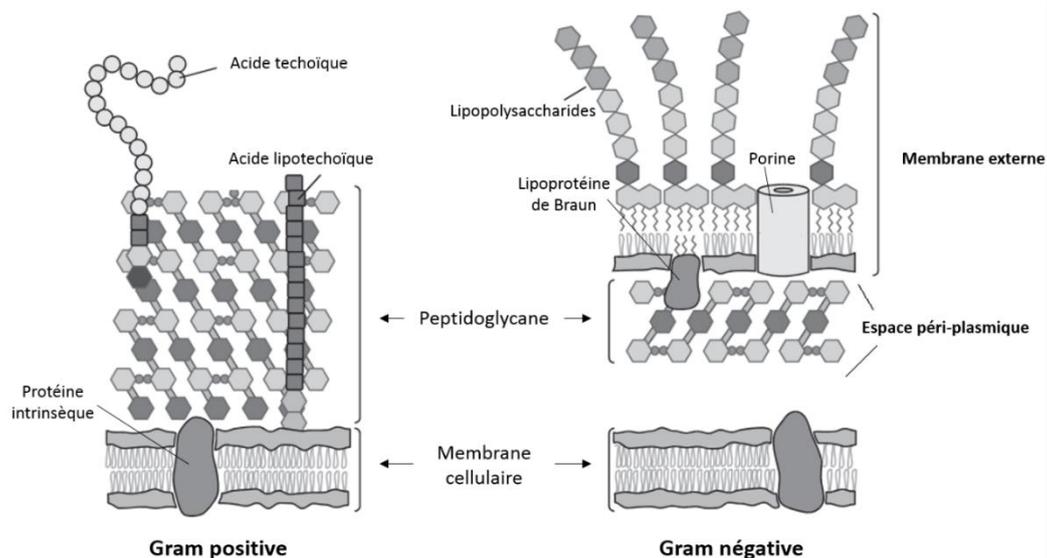


Figure 5 : Composition pariétale des microorganismes Gram à positif et Gram à négatif, adapté de (Silhavy et al. 2010)

- **La paroi des bactéries Gram⁺**, d'une épaisseur de 20 à 50 nm, est composée en grande majorité de PG qui représente environ 90% des constituants pariétaux. Cette paroi se caractérise également par la présence d'acides teichoïques (TA) et d'acides lipoteichoïques (LTA), associés respectivement au peptidoglycane et à la membrane cellulaire. TA et LTA sont composés d'une chaîne principale de polyribitol phosphate ou de polyglycérol phosphate. La paroi des bactéries à Gram⁺ renferme relativement peu de protéines.

- **La paroi des bactéries Gram⁻** est plus complexe et se caractérise par une composante PG beaucoup plus faible (< 15% du poids sec). Dans ce cas, le PG est organisé en une couche mince et peu dense, avec une épaisseur de 5 à 10 nm. Cette couche est surmontée d'une membrane externe, formée d'une double couche phospholipidique, elle-même surmontée de macromolécules de LPS (lipopolysaccharides). Le LPS est constitué du lipide A, enfoui dans la membrane externe, d'un polysaccharide central et de chaînes glucidiques latérales O, projetées vers l'extérieur. La paroi est séparée de la membrane plasmique par l'espace périplasmique. On trouve également des protéines intégrées dans la membrane externe : les protéines de transport (porines) et des lipoprotéines entre le peptidoglycane et la membrane externe (lipoprotéines de Braun) consolidant l'ensemble de la paroi bactérienne.

1.3.2 La croissance cellulaire

A. En mode planctonique

Lors d'une culture planctonique (bien mélangée), les bactéries se trouvent dans un espace relativement homogène au niveau des paramètres physico-chimiques. Dans des conditions environnementales favorables (température, pH, nutriments et oxygène), les cellules bactériennes sont métaboliquement actives et se divisent par scissiparité. Les différentes phases de la croissance sont bien connues et sont illustrées dans la Figure 6. La durée des différentes étapes varie en fonction des microorganismes et des conditions environnementales (substrat, température, teneur en oxygène).

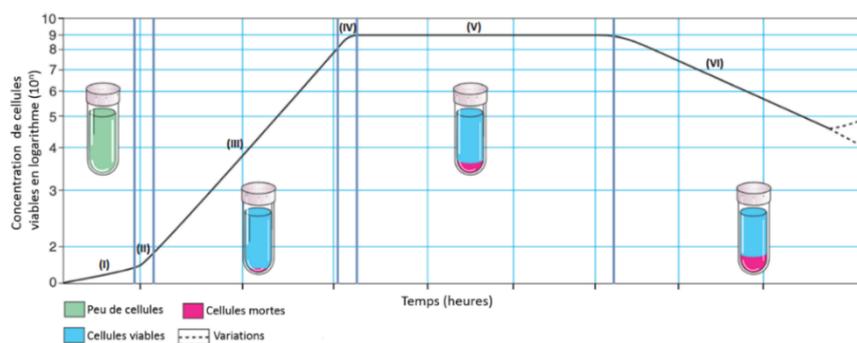


Figure 6 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne, adaptée de (Talaro and Talaro 2002)

Lorsque les cellules sont inoculées dans un milieu, la **phase de latence (I)** correspond à la période d'ajustement métabolique. Les bactéries s'adaptent aux substrats présents dans le milieu et leur nombre n'augmente pratiquement pas. Pendant la **phase d'accélération (II)** il se

produit une augmentation de la vitesse de croissance. Cette phase précède la **phase exponentielle (III)** de croissance au cours de laquelle le taux de croissance est constant et maximum. Lors de cette phase, la biomasse cellulaire est essentiellement constituée de cellules vivantes qui se divisent de façon exponentielle. La **phase de décélération (IV)** s'observe lorsque les conditions deviennent moins favorables (diminution en nutriments et augmentation des déchets métaboliques), la vitesse de croissance cellulaire diminue. Cette phase précède la **phase stationnaire (V)** dans laquelle la population se stabilise. Dans cette phase, les cellules peuvent se retrouver dans différents états métaboliques, certaines cellules arrêtent de se diviser et d'autres se divisent lentement. Enfin, une **phase de déclin (VI)** est observée avec apparition de phénomènes de lyse cellulaire (Talaro and Talaro 2002).

B. En mode biofilm

Du fait même de l'organisation spatiale stratifiée des biofilms, les cellules bactériennes au sein d'un biofilm se trouvent dans un environnement caractérisé par la présence de différents gradients de nutriments et de conditions physico-chimiques hétérogènes (oxygène, pH, molécules signaux du QS) (Figure 7).

Ainsi, dans le cas d'un biofilm immergé, les nutriments et l'oxygène sont amenés par le milieu au niveau des couches supérieures de biofilm. A *contrario*, pour un biofilm aérien, les nutriments sont amenés au niveau de la couche basale du biofilm. Dans le cas d'un biofilm immergé, à titre d'illustration, la concentration d'oxygène décroît au sein des couches du biofilm, l' O_2 pouvant en être totalement absent à une profondeur de 175 μm dans un biofilm de 220 μm d'épaisseur (Stewart and Franklin 2008).

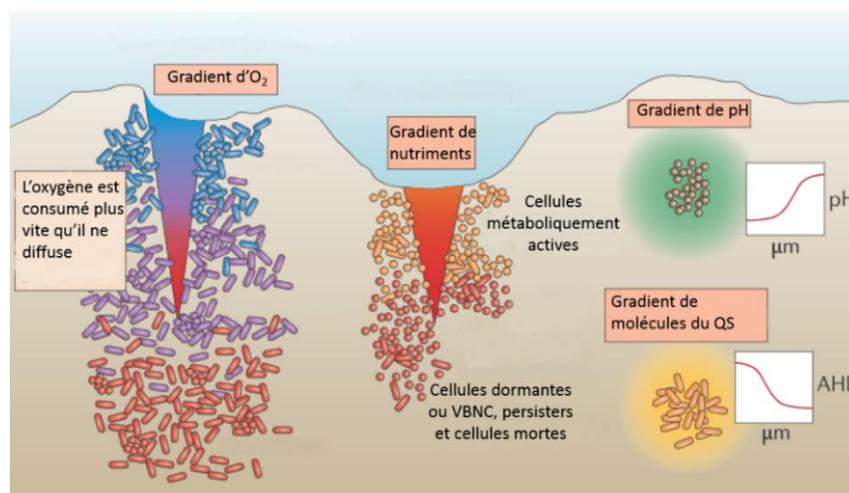


Figure 7 : Diversité des conditions physico-chimiques dans un biofilm immergé (Flemming et al. 2016)

Du fait de leur architecture, les biofilms sont souvent composés de sous-populations bactériennes ayant une hétérogénéité phénotypique (Dufour et al. 2012). En effet, les bactéries doivent adapter leur métabolisme à des micro-conditions locales. Cependant, cette hétérogénéité phénotypique n'est pas seulement le résultat d'une adaptation métabolique, mais peut aussi être due à l'expression stochastique (aléatoire) de gènes ou à l'apparition de variants génétiques (Figure 8) (Stewart and Franklin 2008).

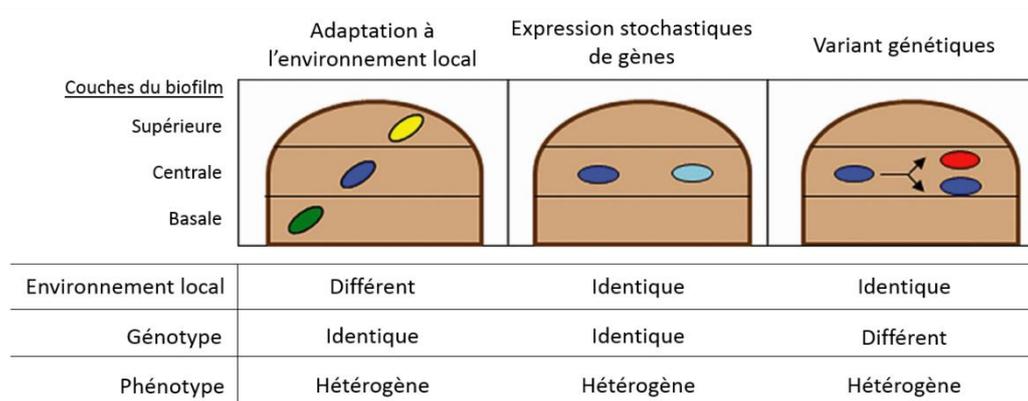


Figure 8 : Les différentes modifications phénotypiques pouvant se produire dans un biofilm (Dufour et al. 2012).

Adaptation métabolique à l'environnement local

Du fait notamment des différents gradients dans le biofilm, la population bactérienne est très hétérogène et est présente sous différents états physiologiques. Ceci amène généralement à une réduction du métabolisme et/ou l'induction d'un état de dormance (Dufour et al. 2012). Il co-existe en effet des cellules métaboliquement actives et des cellules mortes (Figure 9). Dans la zone riche en nutriments et en oxygène, les cellules sont essentiellement des cellules en croissance. À l'inverse, les cellules ayant un métabolisme réduit ou mortes sont retrouvées dans la zone pauvre en nutriments (Flemming et al. 2016).

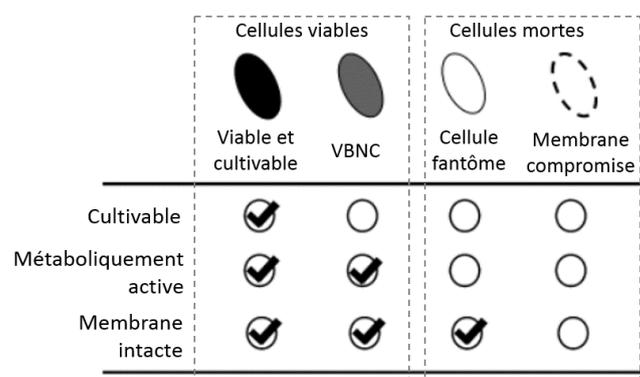


Figure 9 : Illustration des différents états physiologiques retrouvés dans un biofilm (Nocker and Camper 2009)

L'état VBNC (*Viable But Non Culturable*), décrit pour la première fois par Xu et ses collègues, en 1982, correspond à un état cellulaire dans lequel les cellules sont viables, mais sont cependant non détectables par la méthode conventionnelle de culture sur milieu gélosé (Xu et al. 1982). Cet état cellulaire apparaît en réponse à différents types de stress environnementaux. Les cellules en état VBNC conservent une intégrité membranaire et ont une activité métabolique (respiration, expression génique) (Pinto et al. 2013). Cependant, cette activité métabolique est beaucoup plus faible que celle des cellules viables et cultivables (Oliver 2005; Ayrapetyan and Oliver 2016). Ces caractéristiques rendent cette population très résistante à différentes conditions extérieures (déperdition en nutriments, application de biocides). Quand les conditions deviennent plus favorables, les cellules VBNC peuvent ensuite « ressusciter » (McDougald D. 1998; Ayrapetyan et al. 2014; Ayrapetyan and Oliver 2016).

Expression stochastique de gènes

Des variations spontanées de l'expression de gènes peuvent conduire à l'expression de phénotypes hétérogènes au sein d'une population bactérienne. Ces modifications aléatoires proviennent de variations dans l'abondance de certaines protéines du fait de variations dans l'initiation de la transcription ou de la stabilité d'ARNm.

Apparition de variants génétiques

Il peut y avoir aussi formation de variants, sous-populations ayant subi des modifications de leur génome. Ces modifications émergent par mutations spontanées adaptatives et sélection (Stewart and Franklin 2008). Une autre cause possible est par le biais de transferts horizontaux de gènes intra-espèces, qui ont une fréquence très élevée chez les bactéries en biofilm. En effet, la proximité physique des cellules au sein du biofilm facilite le transfert horizontal de matériel génétique par conjugaison ou transformation, permettant ainsi l'acquisition de gènes de résistance aux biocides ou d'autres caractères bénéfiques augmentant les chances de survie de la communauté (Dufour et al. 2012; Lebeaux and Ghigo 2012). Il a été estimé qu'après seulement quelques jours 10% d'une population totale initialement clonale est constituée de ce type de variants (Stewart and Franklin 2008).

1.4 *Persistence des biofilms*

Le mode de vie en biofilm permet aux bactéries une tolérance accrue à de nombreux stress environnementaux ainsi que des capacités de résistance aux défenses immunitaires de l'hôte. Cette tolérance des biofilms aux agressions extérieures est une des caractéristiques les plus remarquables et est particulièrement documentée dans le cas de la tolérance aux antibiotiques (Lewis 2008). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer cette tolérance accrue aux agents antimicrobiens en mode de vie biofilm (Hall-Stoodley et al. 2004; Anderson and O'Toole 2008; Høiby et al. 2010; Dufour et al. 2012; Lebeaux et al. 2014). Quatre mécanismes principaux sont envisagés, Figure 10.

1. **Barrière protectrice de la matrice.** De par ses propriétés structurales et mécaniques, la matrice constitue le premier rempart aux agents antimicrobiens en limitant la diffusion de molécules toxiques au sein du biofilm. De plus, certains composés de la matrice peuvent séquestrer les composés biocides (Davies 2003) La matrice peut ainsi retarder l'accessibilité des antibiotiques aux bactéries, diminuant les doses et laissant le temps aux cellules d'exprimer des mécanismes inductibles de résistance. Il a cependant été montré que certains antibiotiques peuvent pénétrer au sein de biofilms tolérants à ces molécules (Lebeaux and Ghigo 2012)
2. **Diminution de l'activité métabolique des cellules.** L'hétérogénéité phénotypique de la population bactérienne participerait également à la tolérance du biofilm (Dufour et al. 2012). Le métabolisme ralenti de certaines bactéries au sein du biofilm les rend en effet insensibles à certains antibiotiques, en particulier ceux actifs uniquement contre des bactéries en multiplication (par exemple, les β -lactamines). Ceci ne permet pas cependant de rendre compte de la tolérance à certains antibiotiques qui agissent sur des bactéries qui ne divisent pas (par exemple, les quinolones).
3. **Expression de facteurs spécifiques.** L'expression de gènes spécifiques au mode de vie biofilms peut également rendre compte de l'accumulation de nombreuses modifications physiologiques. Il a été montré une augmentation de l'expression de pompes d'efflux chez des souches d'*E. coli* et *P. aeruginosa* en conditions de biofilms, permettant l'élimination de composés toxiques dont les antibiotiques (Mah, T.F. and O'Toole 2001; Stewart and William Costerton 2001; Lebeaux et al. 2014). La participation de ces porines

transmembranaires est cependant controversée et ce mécanisme serait plutôt souche-dépendant (Lebeaux et al. 2014). Chez *P. aeruginosa*, l'accumulation de β -glucanes extracellulaires serait également impliquées dans l'inhibition de la diffusion d'antibiotiques à travers le périplasma.

4. **Présence de persisters.** Les *persisters cells* ou *persisters* sont des cellules en état de dormance. Elles existent aussi bien dans les biofilms que dans les cultures planctoniques et semblent jouer un rôle majeur dans la tolérance aux antibiotiques (Lewis 2008). Ce type de cellules peut représenter moins de 1% de la population de départ et leur génome est identique à celui des autres bactéries. Leur apparition est indépendante de la présence d'antibiotiques, et serait plus en rapport avec une carence nutritionnelle. Elles se caractérisent par une absence de multiplication, mais peuvent reprendre un mode de division normal dans des conditions favorables (après élimination des molécules biocides), et conduire ainsi à la reconstitution d'un biofilm (Lebeaux and Ghigo 2012; Lebeaux et al. 2014; Brauner et al. 2016).

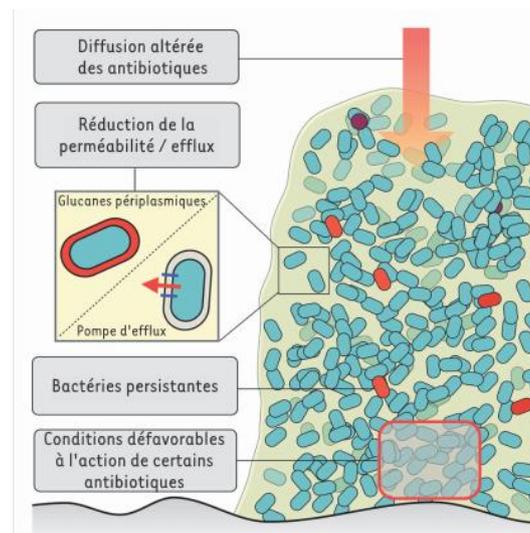


Figure 10 : Hypothèses des mécanismes de résistance des biofilms vis-à-vis de produits biocides (Lebeaux and Ghigo 2012)

La tolérance des bactéries en mode biofilm constitue donc un phénomène multifactoriel et encore mal compris. Les biofilms constituent ainsi des réservoirs de micro-organismes particulièrement résistants aux traitements antimicrobiens et entraînent de sérieux problèmes économiques et de santé publique. Ainsi, la compréhension des mécanismes de formation des biofilms et de leurs particularités structurales et fonctionnelles est primordiale pour développer des moyens de lutte efficace.

2 Décontamination par les technologies Plasma froid et LED UV-C

Les moyens conventionnels de lutte contre les biofilms indésirables reposent essentiellement sur la chaleur (sèche ou humide) et les composés chimiques biocides. Dans le cas de biofilms présents sur des surfaces biotiques, bien évidemment seule la dernière solution peut être envisagée. Cette lutte chimique repose en grande partie sur l'utilisation des antibiotiques dans le domaine médical et de désinfectants chimiques tels que des agents d'oxydation (produits chlorés, peroxyde d'hydrogène) ou des agents de surface (ammoniums quaternaires, tensioactifs anioniques) (Simões et al. 2010).

Du fait de la tolérance intrinsèque des bactéries en mode biofilm, l'éradication des biofilms nécessite l'usage massif de substances biocides, aujourd'hui soumise à une réglementation européenne de plus en plus stricte (Règlement sur les produits biocides, RPB UE N°528/2012). La nécessité de mettre en place des solutions originales pour éliminer efficacement les biofilms apparait clairement. Ces méthodes doivent permettre de limiter à la fois la présence de résidus et les problèmes de résistance au traitement.

Parmi les différentes techniques à faible impact environnemental qui émergent, certaines utilisent des moyens biologiques, comme, par exemple, l'utilisation de bactériophages, d'enzymes ou encore de molécules inhibitrices du quorum sensing (Bridier et al. 2011; Pires et al. 2017). Parallèlement des méthodes de traitement par des procédés physiques sont de plus en plus étudiées. Il s'agit notamment **des jets de plasma à la pression atmosphérique** et des **diodes électroluminescentes émettant dans les ultraviolets** (LED UV-C). Le principe de ces nouvelles technologies ainsi qu'un état des lieux de leurs applications dans le cas de biofilms bactériens vont être décrits plus en détail dans cette partie.

2.1 Les plasmas froids

La technologie des plasmas froids se développe de façon importante depuis ces vingt dernières années (Figure 11). Elle concerne de nombreux domaines d'application tels que la fonctionnalisation de surface, la fabrication de composants micro-électroniques, les applications biomédicales, et tout particulièrement celui de la décontamination-stérilisation de surface. Le nombre de publications dans ce domaine ne cesse de croître depuis le début des années 2000 et a triplé depuis les dix dernières années (Figure 11).

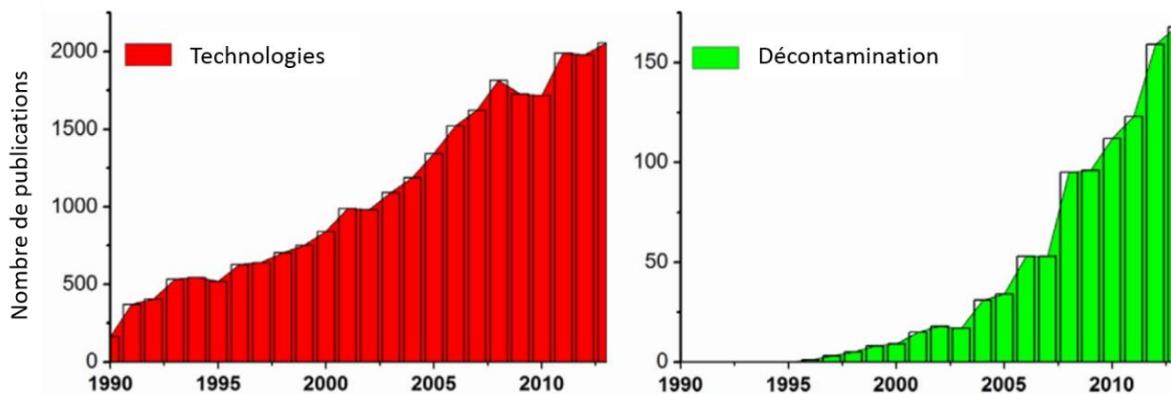


Figure 11 : Nombre de publications sur les plasmas froids (Misra et al. 2016)

2.1.1 Description générale

Le plasma désigne en physique le **quatrième état de la matière**, qui s'ajoute aux états solide, liquide et gazeux (Figure 12) (Tendero et al. 2006; Gupta et al. 2016). C'est l'état majoritaire de la matière dans l'univers (plus de 99%), bien qu'il soit peu présent naturellement sur Terre. Les étoiles et les aurores boréales en sont des exemples (Tendero et al. 2006).

Un plasma est un **gaz, totalement ou partiellement ionisé**, composé d'un mélange d'électrons, d'atomes, d'ions, de radicaux libres et de photons (Scholtz et al. 2015; Liao et al. 2017). Dans le plasma, les électrons ou les photons ionisent les atomes et les molécules du gaz en formant des ions qui eux-mêmes, par cascade, interagissent avec les atomes et molécules du gaz pour former d'autres ions (positifs et négatifs), des radicaux libres (atomes ou molécules hautement instables possédant un électron non apparié), des atomes et des molécules métastables ou excités (Gupta et al. 2016).

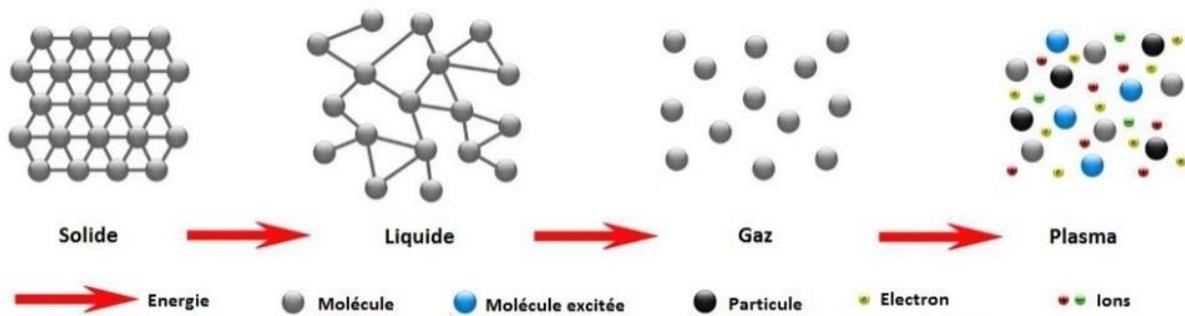


Figure 12 : Représentation schématique des 4 états de la matière (<http://matieretpe.e-monsite.com/pages/i-le-plasma/>)

Dans sa globalité, un plasma est **électriquement neutre**, la densité des électrons (n_e) est égale à la densité des espèces ionisées (n_+) (Liao et al. 2017). Toutes les particules ne sont cependant pas forcément ionisées dans un plasma, et le degré d'ionisation (β) est un paramètre important pour le caractériser. Un autre paramètre important est celui de la température des composés du plasma.

Les plasmas sont généralement classés en fonction de ces deux paramètres et on distingue ainsi (Tendero et al. 2006; Gupta et al. 2016; Liao et al. 2017) :

- Les « **plasmas chauds** » dits de fusion. Ces plasmas sont à l'équilibre thermodynamique complet ($\beta=1$) et à des températures de plusieurs millions de degrés. C'est le cas des étoiles dont les plasmas sont créés par fusion thermonucléaire.
- Les « **plasmas froids** » qui sont eux-mêmes divisés en deux catégories :
 - ✓ Les **plasmas thermiques** dits à l'**équilibre thermodynamique** avec une température du gaz de plusieurs milliers de degrés tels que les torches à plasmas, arcs électriques et naturellement les éclairs. Il s'agit de plasmas très collisionnels, avec une température des électrons (T_e) similaire à celle des particules qui composent le gaz (T_i).
 - ✓ Les **plasmas froids** dits **hors équilibre thermodynamique**, faiblement ionisés, dans lesquels la température du gaz est proche de la température ambiante. Dans ce cas, le plasma n'est pas à l'équilibre thermodynamique ; la température des électrons est nettement plus élevée (jusqu'à 10^5 K) que celles des ions ; le plasma reste à une température proche de l'ambiante.

Bien évidemment, les plasmas utilisés pour des applications en rapport avec des cellules/tissus vivants sont les plasmas froids à la pression atmosphérique. En effet, du fait de leur faible température ($T < 40^{\circ}\text{C}$ en général), ils sont applicables sur une grande variété de surfaces, de biomatériaux et de tissus vivants sensibles à la chaleur, sans induire une augmentation significative de la température (Laroussi 2009). De plus, leur génération à la pression atmosphérique ne nécessite pas d'enceinte de vide et de systèmes de pompage, comme pour ceux générés à basse ou moyenne pression.

2.1.2 Plasmas froids à la pression atmosphérique

Les plasmas froids à la pression atmosphérique peuvent être produits expérimentalement par décharges électriques (ou électromagnétiques) dans un gaz. Le champ électrique a pour effet d'accélérer les électrons libres à des énergies suffisantes (tension dite de claquage) pour qu'ils puissent, par collisions, ioniser les molécules du gaz plasmagène.

Les gaz plasmagènes utilisés sont des gaz rares, comme l'hélium ou l'argon, des gaz moléculaires (N_2 , O_2) mais aussi l'air ambiant (Scholtz et al. 2015; Gupta et al. 2016). Ils sont employés seuls ou en mélange, avec des proportions variables de chacun des gaz.

Différents types de réacteurs permettent de générer de tels plasmas froids : les décharges couronnes, les décharges à barrières diélectriques, la micro-décharge à cathode creuse ou encore radiofréquence (RF) ou micro-onde (WF) (Tendero et al. 2006; Gupta et al. 2016; Liao et al. 2017).

La plupart des dispositifs sont développés de façon interne par les laboratoires et correspondent donc à des prototypes expérimentaux. Seuls quelques-uns sont actuellement commercialisés tels que le système kINPen[®] MED (NeoPlas tools, Allemagne), commercialisé depuis 2013 et opérant avec de l'argon et le système Atomflo 250 ou 300 reactor (Surfx technologie, CA, USA) opérant également avec de l'argon.

Les deux types de systèmes les plus utilisés pour des applications biomédicales sont les décharges à barrières diélectriques et les jets de plasmas, Figure 13 (Liao et al. 2017).

- Les **décharges à barrière diélectrique (DBD)** sont formées entre deux électrodes plates recouvertes par un matériel diélectrique (plastique ou verre) (Scholtz et al. 2015). Le matériel diélectrique permet de limiter le courant et évite le passage à l'arc électrique (Pankaj et al. 2018). Le plasma est généré dans l'espace entre les deux électrodes en utilisant le plus souvent

de l'hélium additionné d'O₂. L'échantillon biologique est installé directement dans l'espace où le plasma est formé (appelé zone de décharge). Ce type de système peut être configuré pour traiter de grands volumes dans un temps relativement court. En revanche, l'échantillon est exposé à un champ électrique très élevé (Gupta et al. 2016; Turner 2016).

- Le second type de système correspond aux **jets de plasma**. Ces dispositifs comportent deux électrodes (avec différentes configurations possibles) dont une électrode intérieure reliée au générateur qui entraîne l'ionisation du gaz injecté (Pankaj et al. 2018). L'échantillon est dans ce cas soumis à un flux gazeux dit de post-décharge (*after glow*). La Figure 13 illustre le 'panache' de plasma ainsi formé. À l'œil nu, la plume de plasma apparaît continue alors qu'elle est formée de fronts d'ionisation périodiques se déplaçant de la sortie du jet vers la cible à grande vitesse et qui est appelée balles de plasma (*plasma bullets*). Ce système a pour avantage de pouvoir traiter aussi bien des liquides que des solides de façon localisée sans que l'échantillon ne soit soumis au champ électrique (Scholtz et al. 2015; Misra et al. 2016). En comparaison avec le système DBD, la zone de post-décharge contient moins de particules chargées mais surtout des radicaux libres et des espèces excitées, métastables ou radiatives.

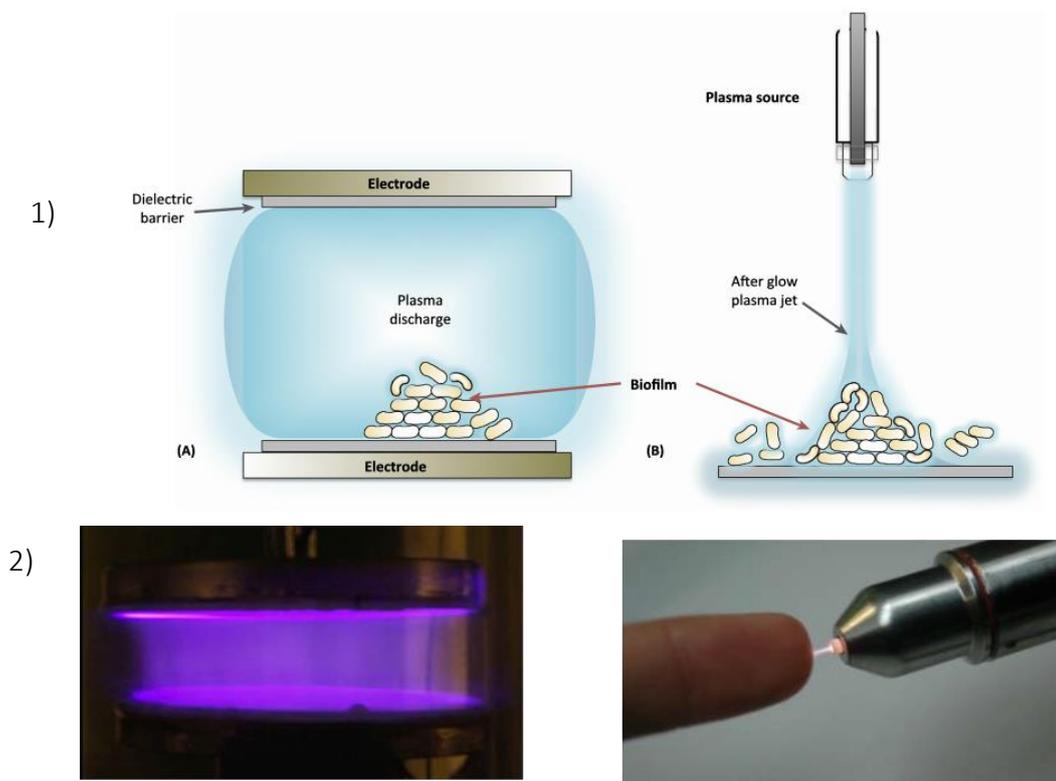


Figure 13 : Systèmes plasma, 1) schéma du principe et 2) Photo du dispositif
Et en A) décharges à barrières diélectriques (DBD), B) jet de plasma (Gilmore et al. 2018)

Selon les systèmes et le gaz plasmagène utilisé, une très grande variété d'espèces réactives sont produites, Figure 14 (Scholtz et al. 2015; Liao et al. 2017). Les collisions entre particules entraînent la production d'espèces chimiques primaires actives qui interagissent notamment avec les molécules de l'air (O_2 , N_2 , H_2O) conduisant à la formation de nombreuses espèces secondaires.

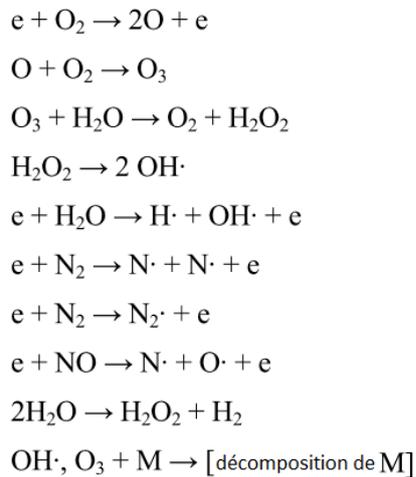


Figure 14 : Quelques exemples de réactions chimiques possibles au sein du plasma (Korachi and Aslan 2013), avec M : molécule cible, partenaire de collision

Au final, le réacteur plasma peut être vu comme un système de conversion d'énergie électrique en énergie chimique. Les plasmas sont donc sources de très nombreuses espèces chimiques telles que des **espèces réactives de l'oxygène** (ROS, *Reactive oxygen species*) comme l'ion hydroxyle (OH^-), l'ion superoxyde (O_2^-), l'ozone (O_3) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des **espèces réactives de l'azote** (RNS, *Reactive nitrogen species*) telles que l'azote atomique (N) et l'oxyde d'azote (NO) ainsi que des **photons ultraviolets** (Mai-Prochnow et al. 2014; Scholtz et al. 2015; Liao et al. 2017). Ces composés sont bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes et sont cités comme responsables des effets biologiques des plasmas.

Pour un même dispositif, la sélection et le contrôle des paramètres opératoires permettent de faire varier la nature et la concentration des espèces réactives générées : choix du gaz ou des mélanges de gaz et du flux de gaz, choix de l'alimentation (tension, puissance électrique, fréquence). La caractérisation de cette production est le plus souvent réalisée par spectrométrie d'émission optique (OES).

2.1.3 Domaines d'application des plasmas froids

Les propriétés chimiques et physiques des plasmas froids, leur capacité à traiter des objets 3D complexes et la possibilité de créer des dispositifs biocompatibles sont valorisées depuis une vingtaine d'années et leur intérêt ne cesse de croître. Ceci a même conduit au développement d'un domaine de recherche spécifique, appelé Plasma Médecine, très interdisciplinaire (Figure 15).

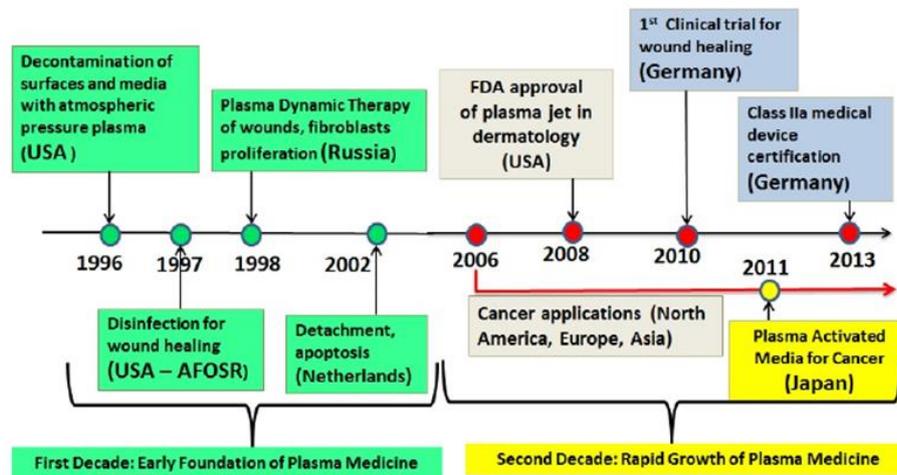


Figure 15 : Chronologie des étapes importantes des applications biomédicales des plasmas froids (Laroussi et al. 2017)

Les propriétés des plasmas froids peuvent être mises à profit dans différents domaines : biomédical, agroalimentaire et celui de la stérilisation/décontamination de surface.

Les premières applications des plasmas froids ont été dans un objectif de **décontamination/stérilisation** de matériaux thermosensibles inertes (instruments médicaux). Dans ce contexte, l'effet des plasmas a été étudié sur différents types de micro-organismes : bactéries (Sharma et al. 2009; Joshi et al. 2010) , levures et moisissures (Rupf et al. 2010; Lee et al. 2014), spores (Hertwig et al. 2015) et virus (Zimmermann et al. 2011; Wu et al. 2015). Dans le cas des bactéries, bien sûr, les premières études ont concerné la forme planctonique, mais de nombreux travaux se sont ensuite intéressés à la problématique des biofilms (voir p. 63 pour plus de détails).

Les plasmas sont aussi utilisés pour des applications **en dermatologie**, par exemple pour le traitement de plaies chroniques et d'ulcères. Différentes études réalisées *in vivo* sur des plaies chroniques contenant des souches multi-résistantes ont permis d'observer une diminution de la zone infectée après traitement (Ermolaeva et al. 2011; Daeschlein et al. 2015). Ils sont également exploités pour favoriser la **coagulation du sang et la cicatrisation** (Yousfi et al. 2014)

ou encore pour des **soins dentaires** (blanchiment, décontamination des dents et des instruments) (Hoffmann et al. 2013; Scholtz et al. 2015). Enfin, les plasmas froids sont mis à profit pour le **traitement de cellules cancéreuses** *in vivo* et *in vitro*, sans dommages apparents sur les cellules normales (Keidar et al. 2011; Yousfi et al. 2014; Judée et al. 2016; Laroussi et al. 2017). La première description d'un tel effet *in vitro* date de 2007 (effet d'un système DBD sur mélanome) et *in vivo* de 2011 (Vandamme et al. 2010). Depuis des résultats très prometteurs ont été obtenus même sur des formes agressives comme les carcinomes, des cancers de la peau et des tumeurs cérébrales. Le traitement plasma induirait un phénomène d'apoptose cellulaire, empêcherait la prolifération des cellules cancéreuses et diminuerait la taille des tumeurs (Schlegel et al. 2013).

Des applications **en agroalimentaire** ont également été décrites pour le traitement de différents produits/ingrédients alimentaires tels que des fruits et légumes frais, des fruits secs, des filets de viandes ou de poissons (Schlüter et al. 2013; Pankaj et al. 2018). Ces traitements permettent notamment d'augmenter la durée de conservation des produits par inactivation de micro-organismes présents à leur surface, tout en conservant leurs qualités organoleptiques.

Plus récemment, le **traitement de semences** par des plasmas froids a été expérimenté pour favoriser leur décontamination et leur germination (Gupta et al. 2017).

2.1.3.1 Mécanismes d'action des plasmas froids sur les bactéries

Il est généralement admis que les propriétés antimicrobiennes des plasmas froids sont attribuées, de façon prédominante, à la production d'espèces réactives (ROS et RNS ou RNOS) et dans certains cas aux ultraviolets et aux particules chargées. Cependant, les mécanismes exacts mis en jeu sont encore mal compris (Laroussi 2002; Mai-Prochnow et al. 2014; Liao et al. 2017; Bourke et al. 2017; Laroussi 2018).

Stress oxydatif

Les ROS tels que O_2 , O_2^- , OH^- et H_2O_2 sont bien connus pour induire un stress oxydatif, avec pour cible l'ensemble des macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipides et glucides) (Cabiscol et al. 2000). Leur implication dans l'activité antimicrobienne des plasmas a été démontrée par le fait que l'efficacité du traitement peut être augmentée par l'ajout d'un certain pourcentage d'oxygène dans le gaz plasmagène (Liao et al. 2017; Flynn and Gilmore 2018). À l'inverse, l'ajout de molécules antioxydantes ou de capteurs de radicaux libres

(catalase, acide ascorbique, vitamine E, ...) se traduit par une diminution de l'effet biocide (Judée et al. 2014; Flynn and Gilmore 2018). En particulier, un rôle prépondérant est attribué au radical hydroxyle du fait que les bactéries n'ont pas de mécanisme de détoxification envers ce composé, en comparaison avec l'ion superoxyde et l' H_2O_2 .

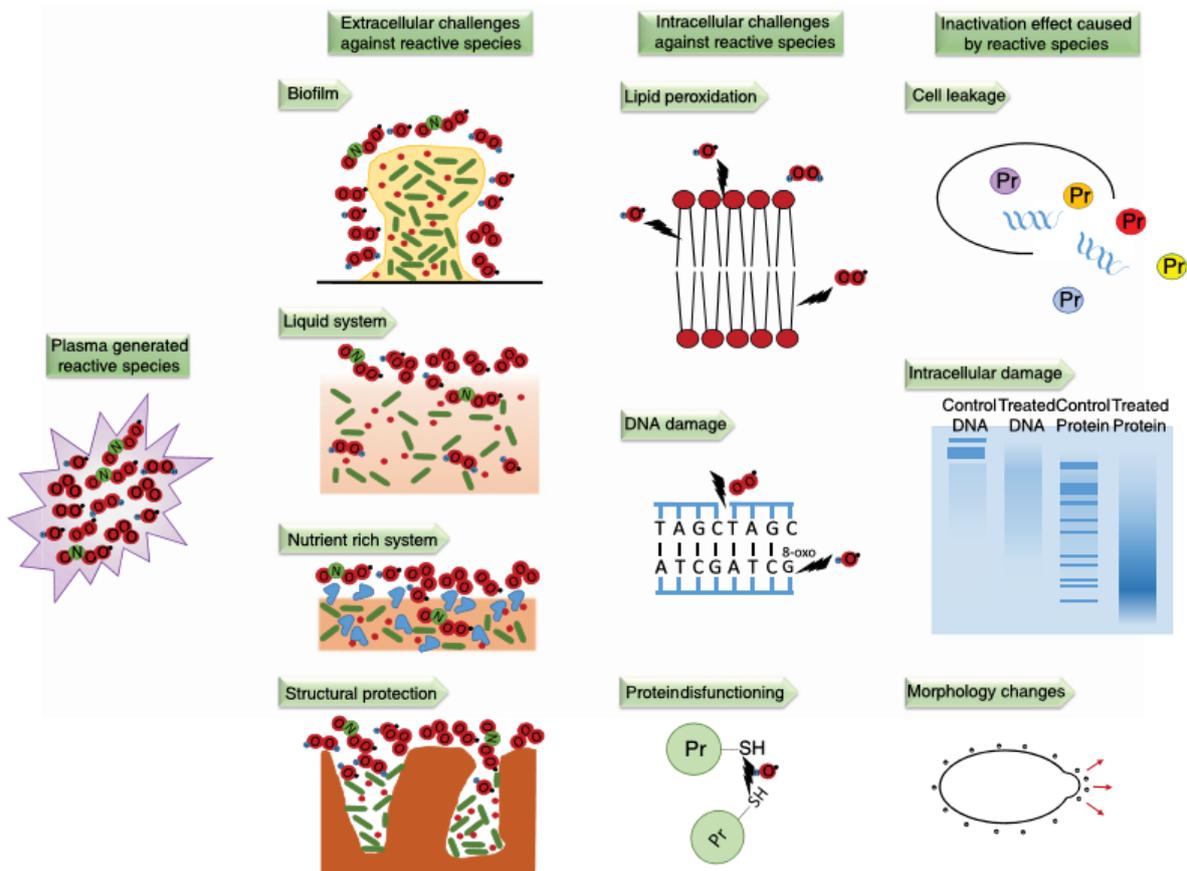


Figure 16 : Hypothèse sur les mécanismes d'action des jets de plasmas froids (Bourke et al. 2017)

Ce stress oxydatif entraînerait une **diminution de la perméabilité cellulaire** (perte de l'intégrité pariétale/membranaire), des **dommages aux molécules d'ADN** et aux **protéines** (membranaires et intracellulaires), Figure 16 (Patil and Bourke 2016; Liao et al. 2017). L'ensemble de ces modifications contribuant à la lyse des cellules.

Ces effets sur les macromolécules biologiques peuvent être aussi responsables de modifications dans la structure des enveloppes bactériennes, ce qui se traduit parfois par la mise en évidence de **modifications morphologiques des cellules** après traitement (Patil and Bourke 2016; Liao et al. 2017). Une action sur le peptidoglycane de la paroi bactérienne, comme le suggèrent des travaux de modélisation, peut-être responsable d'une lyse hypotonique et participer ainsi à la mort cellulaire (Yusupov et al. 2013).

Sur le plan des mécanismes mis en jeu, on peut évoquer :

- La **peroxydation des lipides** au niveau membranaire (membrane externe/ interne). Il a ainsi été montré que la quantité de malondialdéhyde (MDA), un biomarqueur de la peroxydation lipidique, augmente de façon linéaire en fonction de la durée temps de traitement (Joshi et al. 2010; Okazaki et al. 2014).
- L'**oxydation et la modification de la conformation des protéines**. L'application d'un traitement plasma sur des protéines purifiées a permis d'observer des ruptures de liaisons hydrogène, sulfate et Van der Waals (Laroussi 2018). Dans une étude récente sur le lysozyme par exemple, il a été montré que le traitement (DBD et jet de plasma) entraîne plusieurs modifications structurales (mises en évidence par cristallographie aux rayons X) et une diminution de l'activité enzymatique (Choi et al. 2017). La dégradation de protéines par rupture de la liaison peptidique a également été mise en évidence (Hosseinzadeh Colagar et al. 2013).
- **Dégradation de l'ADN bactérien**. Quelques travaux ont mis en évidence l'effet d'un traitement plasma sur les molécules d'ADN, avec la description de cassures simple brin ou double brin (Patil and Bourke 2016; Liao et al. 2017). Hosseinzadeh Colagar *et al.* ont par exemple montré qu'un traitement par un jet de plasma (argon/air) dégrade totalement l'ADN génomique d'*E. coli* en 3 min (Hosseinzadeh Colagar et al. 2013).

Par ailleurs, des analyses de transcriptomique sur une suspension d'*Escherichia coli* soumise à un jet de plasma froid (argon) ont révélé l'expression différentielle d'une centaine de gènes (Sharma et al. 2009). Les gènes surexprimés (une 50^{aine} de gènes) correspondent essentiellement à des gènes du système SOS et impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*oxyS* et *katG*). Les gènes sous-exprimés (également une 50^{aine} de gènes) sont surtout des gènes de ménage (exemple, gène de transport intracellulaire). Ces résultats illustrent également l'implication du traitement plasma dans l'induction d'un stress oxydatif important avec une réponse cellulaire adaptée à la détoxification des ROS et plus générale avec l'induction des mécanismes de réparation de l'ADN.

Autres effets

Par ailleurs, il a été émis l'hypothèse que les traitements induisent une **acidification** au niveau intracellulaire, qui interviendrait également dans l'induction de la lyse cellulaire (Bourke et al. 2017). Peu d'études ont encore été réalisées sur ce sujet. (Ikawa et al. 2010) ont montré que

l'exposition au plasma d'une suspension d'*E. coli* entraîne une acidification du milieu, causée par la dissolution des ions nitrates et nitrites.

D'autres études ont souligné que les traitements plasma pourraient induire un état de dormance, l'état **viable non cultivable (VBNC)**, dans une partie de la population bactérienne (Abramzon et al. 2006; Brelles-Mariño 2012; Dolezalova and Lukes 2015).

La contribution des effets biocides bien connus des **ultraviolets (UV)** est très contradictoire dans la littérature. Selon le système et les conditions opératoires, les UV semblent être responsables de l'effet antimicrobien principal (Judée et al. 2014) ou à l'inverse avoir peu d'effets (Laroussi and Leipold 2004; Dobrynin et al. 2009; Kolb et al. 2012). Des études réalisées en présence de filtres bloquant le passage des UV semblent démontrer que ceux-ci ne sont pas responsables directement de l'effet antimicrobien. Cependant, les radiations UV peuvent jouer un rôle dans la production d'espèces réactives, particulièrement le radical hydroxyle par mécanisme de photolyse de l'eau (Gilmore et al. 2018).

Enfin, le traitement physique peut induire un **stress électrostatique**. Suivant le type de dispositif, le plasma induit la production de particules chargées qui vont s'accumuler sur la surface des bactéries et qui peuvent induire une rupture de la membrane externe (Mendis et al. 2000).

L'effet biocide des plasmas froids semble donc être dû à l'effet additif et synergique de différents mécanismes. Étant donné la complexité cellulaire ainsi que celle de la chimie des plasmas, il est difficile d'évaluer précisément les effets et la contribution de chacune des différentes espèces réactives produites.

2.1.3.2 Inactivation des micro-organismes sous la forme planctonique

De nombreuses études très prometteuses ont été réalisées sur différentes espèces bactériennes, notamment pathogènes, sous la forme planctonique (Mai-Prochnow et al. 2014; Scholtz et al. 2015; Liao et al. 2017).

L'effet biocide des plasmas froids sur les cellules planctoniques est évalué de façon qualitative (observation des dommages aux cellules par microscopie électronique ou confocale) ou quantitative. Dans ce dernier cas, il peut s'agir de mesures du diamètre d'inhibition de la croissance après traitement d'un tapis bactérien en surface d'un milieu gélosé (de façon un peu similaire à l'évaluation de l'effet des antibiotiques) (Cao et al. 2011). La majorité des études, notamment récentes, sont cependant réalisées par dénombrement de la population

bactérienne (quantification du nombre d'unités formant colonies, CFU), ce qui permet d'accéder de façon plus précise à la cinétique du processus d'inactivation (Yu et al. 2006; Joshi et al. 2010; Mai-Prochnow et al. 2016). L'efficacité du traitement est ensuite exprimée par le niveau de réduction logarithmique de la population bactérienne. Parfois, par analogie avec l'évaluation de l'efficacité des traitements thermiques, l'efficacité est exprimée par le temps de réduction décimale (valeur D ou D_{10}) qui représente le temps nécessaire pour réduire la population de 90%.

L'efficacité de destruction de cellules planctoniques résistantes aux antibiotiques a été largement étudiée. Par exemple (Alkawareek et al. 2014) ont décrit dans le cas de souches de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (MRSA) un taux de 100% d'élimination de la population initiale (soit 6 \log_{10} de réduction) après seulement 120 s de traitement (jet de plasma He/ O_2). Dans une autre étude, ce même niveau d'éradication est retrouvé sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* après 5 min de traitement par un système DBD (Han et al. 2015). Cependant, la réduction de la population bactérienne peut être beaucoup plus faible, avec une perte de la viabilité cellulaire de seulement 50 à 80% (jet de plasma, He) (Lunov et al. 2016).

Ces disparités dans les résultats sont attribuées à la diversité des dispositifs plasma et des conditions opératoires (distance entre l'échantillon et le système de traitement, la température et d'humidité lors du traitement, ...) (Figure 17), qui influencent directement le potentiel antimicrobien du plasma. La comparaison des effets entre différentes publications, même dans le cas d'une espèce bactérienne donnée, est de ce fait assez difficile.

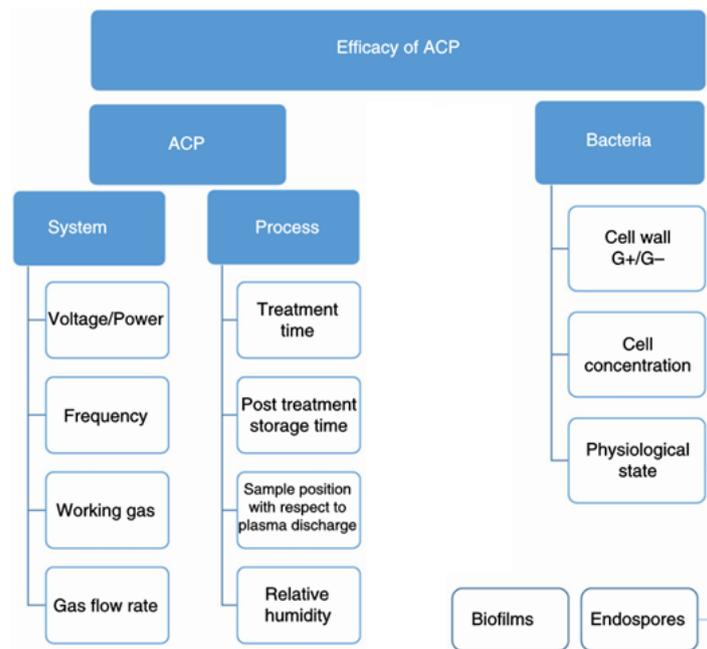


Figure 17 : Paramètres physiques et biologiques intervenant dans l'efficacité biocide d'un traitement plasma froid – adapté de (Bourke et al. 2017)

De nombreux travaux suggèrent que les bactéries à **Gram⁻** sont plus sensibles aux effets biocides des plasmas froids que les bactéries à **Gram⁺**, en lien avec leur différence de composition pariétale, et notamment l'épaisseur du peptidoglycane (Lunov et al. 2016; Mai-Prochnow et al. 2016). D'autres résultats cependant ne révèlent pas de différence significatives (Helgadóttir et al. 2017) et d'autres observent au contraire une plus grande résistance des bactéries à Gram⁻ (Lu et al. 2014). Comme évoqué précédemment, ces disparités peuvent être attribuées à la très grande variabilité des paramètres expérimentaux. De plus, ces travaux ne tiennent pas toujours compte de la **densité de la population bactérienne initiale**, qui est parfois très différente (de 10^3 à 10^9 CFU.mL⁻¹). Or même si peu d'études ont abordé l'effet de la **densité cellulaire** sur l'efficacité des plasmas froids, quelques travaux montrent bien que ce paramètre influe sur la réponse au traitement. (Yu et al. 2006; Kamgang et al. 2007; Joshi et al. 2010; Fernández et al. 2012). Ainsi, Fernández et al. 2012 ont obtenu avec *Salmonella Typhimurium* une réduction maximale de 3 log₁₀ en 5 min. de traitement pour une concentration de 10⁶ cellules/filtre et seulement de 2 log₁₀ en 8 min pour une concentration de 10⁸ cellules/filtre (Figure 18).

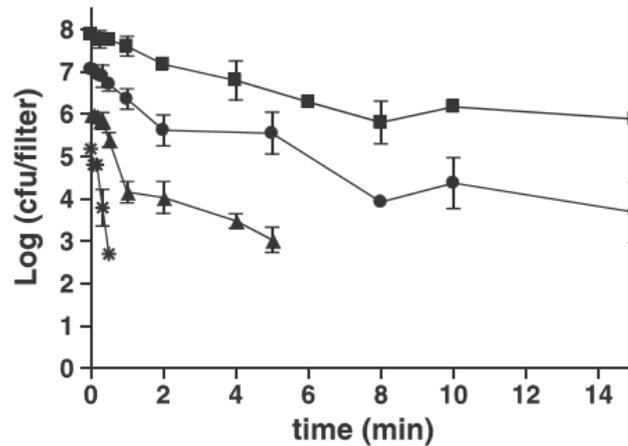


Figure 18 : Effet de la densité cellulaire initiale sur l'efficacité antibactérienne d'un jet de plasma froid ; Utilisation d'un jet de plasma CP121 Plasma Demonstrator OMVE, 12 L.min⁻¹ de gaz d'azote, d=2,5 cm, suspensions de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* déposées sur filtre de polycarbonate (Fernández et al. 2012)

2.1.3.3 Inactivation des micro-organismes sous la forme de biofilm

L'étude de l'efficacité biocide de traitements au plasma froid sur des biofilms bactériens est assez récente et a fait l'objet de plusieurs revues ces deux dernières années (Puligundla and Mok 2017; Bourke et al. 2017; Flynn and Gilmore 2018; Gilmore et al. 2018).

Sans trop de surprise, il a été montré que la forme biofilm a une résistance accrue envers le traitement plasma. Une des premières études dans le domaine est celle de Kamgang et al. 2007 utilisant un jet de plasma généré par de l'air ambiant saturé en eau. Les auteurs ont comparé la destruction d'une population bactérienne de *Staphylococcus epidermidis* sous forme de cellules planctoniques (10⁷ UFC.mL⁻¹), de cellules adhérentes (2 h d'adhésion, 10⁶ UFC.cm⁻²) et de biofilms de 24 h (10⁸ UFC.cm⁻²) (Kamgang et al. 2007). Quelle que soit la durée de traitement, la forme biofilm a une résistance accrue : après 15 minutes de traitement, la réduction de la population bactérienne est d'environ 6 log₁₀ pour les cellules planctoniques alors qu'elle n'est que de 2 log₁₀ pour les biofilms et d'une valeur intermédiaire, proche de 4 log₁₀, pour les cellules adhérentes.

La Figure 19 présente un exemple typique de courbe d'inactivation de la population bactérienne, dans laquelle on observe un effet dose-réponse. L'allure bi-phasique de la courbe de survie a été attribuée au fait d'une destruction rapide des bactéries dans la couche superficielle du biofilm, suivie d'une phase plus lente dans les couches inférieures.

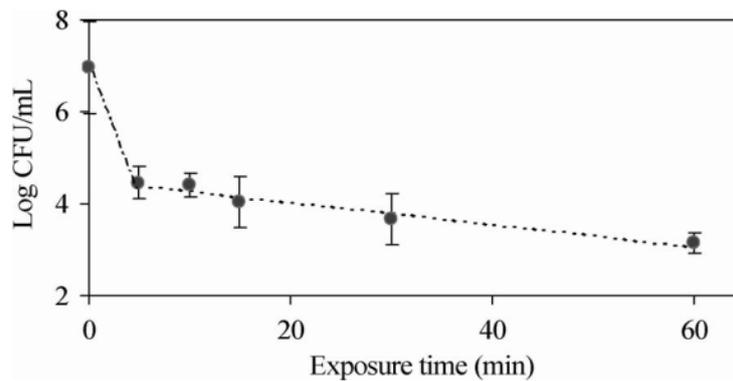


Figure 19 : Cinétique d'inactivation de la population bactérienne Utilisation d'un jet de plasma commercial Atomflo 250 (Surfx Technologies) avec $20,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ de gaz d'hélium et $0,305 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ de gaz de néon, $d = 0,7 \text{ cm}$, biofilm de *Chromobacterium violaceum* de 96h, en microplaques 96 puits (Abramzon et al. 2006)

La question de la diffusion des espèces réactives du plasma à travers l'épaisseur d'un biofilm a bien évidemment été soulevée. L'action antimicrobienne ne semble pas limitée uniquement aux couches superficielles du biofilm. En effet, une action a été décrite sur l'ensemble d'un biofilm de $15 \mu\text{m}$ d'épaisseur de *Porphyromonas gingivalis* (bacille Gram⁻) (Xiong et al. 2011) ou même de $25 \mu\text{m}$ d'un biofilm d'*Enterococcus faecalis* (Pei et al. 2012). Cependant, d'autres travaux ont montré que l'efficacité d'un plasma argon est en fonction de l'épaisseur d'un biofilm de *P. aeruginosa* (Ermolaeva et al. 2011). De plus, (Alkawareek et al. 2012b) ont décrit la pénétration du plasma (He/O_2) dans des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 entre 40 et $80 \mu\text{m}$ de profondeur. Ces études sont cependant limitées par l'épaisseur du biofilm étudié et ne permettent pas de démontrer les limites de pénétration du plasma dans un biofilm. Les travaux réalisés sur des tissus-modèles tels que des films de gélatine suggèrent que les RNOS peuvent pénétrer jusqu'à $1,5 \text{ mm}$ de profondeur (Laroussi et al. 2017).

Comme dans le cas des études sur les bactéries planctoniques, le **niveau d'efficacité biocide** est très variable au sein de la littérature. Le Tableau 2 (p. 66) illustre la grande diversité des paramètres physiques et biologiques lors de traitements de biofilms par plasma froid, ainsi que la variabilité des résultats obtenus. Pour ne prendre que l'exemple de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* avec les quatre études suivantes (Alkawareek et al. 2012a; Flynn et al. 2015; Mai-Prochnow et al. 2016; Helgadóttir et al. 2017), si l'efficacité varie peu entre les études (de 99,5 à 100% d'efficacité), les différentes conditions expérimentales sont elles très variables : le temps de traitement (de 240 s à 60 min), la densité cellulaire initiale (de 3,5 à $8,7 \log_{10}$) ou encore la méthode de formation des biofilms (biofilms immergés sur coupons en acier ou de verre ou biofilms en microplaques 96 puits).

Par conséquent, on retrouve la même problématique de la grande diversité des paramètres physiques et biologiques évoqués dans le cas des cellules planctoniques, mais avec en plus ici le paramètre variabilité des biofilms (densité initiale, type de support, âge du biofilm,).

Par ailleurs, si de nombreuses publications évoquent un rôle de la **matrice extracellulaire** du biofilm comme barrière protectrice envers l'effet biocide des plasmas froids, encore peu de données expérimentales permettent d'étayer cette affirmation.

Des travaux antérieurs du laboratoire suggèrent un effet protecteur d'une matrice polysaccharidique (glucanes) lors de l'exposition de biofilms de la bactérie lactique *Weissella confusa* par un jet de plasma généré par l'air ambiant (Marchal et al. 2012). De même, lors d'une communication à un congrès, il a été décrit que des biofilms de souches mucoïdes de *P. aeruginosa* sont moins sensibles (diminution de 0,5 log₁₀ au temps maximal d'action) que ceux formés par des souches non mucoïdes (Gilmore 2015). Des mutants déficients dans la production d'exopolysaccharides matriciels (*pelA*-, *fleQ*-) semblent plus sensibles que la souche parentale, et inversement une souche surproductrice d'alginate (mutant *mucA*-) présente une résistance accrue.

De plus, l'addition d'alginate à une suspension planctonique de la souche non mucoïde PAO1 réduit l'effet biocide ; le pourcentage de survie de la population bactérienne passe de 51% sans alginate à 91% en présence de 1,25% d'alginate. L'addition d'ADN à 75 µg.mL⁻¹ aurait le même type d'effet ; et un effet additif dans le cas de l'ajout à la fois d'ADN et d'alginate a été observé (Gilmore 2015).

Plus récemment, (Khan et al. 2016) ont décrit une modification des fractions protéique, polysaccharidique et lipidique de biofilms bactériens exposés à un plasma de type DBD, en réalisant une analyse globale des biofilms par spectrométrie infrarouge (ATR-FTIR). Suivant la bactérie étudiée, le rapport protéines/polysaccharides diminue de 10 à 25%.

Par ailleurs, certaines études ont également mis en évidence un effet du traitement plasma sur **le quorum-sensing**. En effet, l'exposition à un plasma froid entraîne une diminution de l'expression de facteurs de virulence régulés par le quorum-sensing tel que la pyocyanine et l'élastase chez *P. aeruginosa* (Ziuzina et al. 2015; Flynn et al. 2016). Dans le même sens, le traitement plasma peut entraîner aussi la perte d'adhésion des cellules ainsi que la perte de structure et de la stabilité du biofilm (Zelaya et al. 2010; Kovalova et al. 2016).

Tableau 2 : Illustration des diversités de paramètres physique et biologique lors du traitement de biofilms dans la littérature

Caractéristiques des plasmas froids utilisés	Distance	Température du plasma	Espèces bactériennes	Type pariétal	Supports	Biofilms	Concentration initiale (log)	Temps de traitements avec effet maximal	Réduction logarithmique	Référence
Jet d'argon (KInPen Med)	ND	ND	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	Coupons en acier	24 h	3,5 log (CFU.cm ²)	10 min	-3,5	(Mai-Prochnow et al. 2016)
			<i>Pseudomonas libanensis</i>	Gram -			4,2 log (CFU.cm ²)		-3,5	
			<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram -			4 log (CFU.cm ²)		-3,2	
			<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +			2,5 log (CFU.cm ²)		-0,7	
			<i>Koeruria carniphila</i>	Gram +			5,5 log (CFU.cm ²)		-2,2	
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram +			3,85 log (CFU.cm ²)		-1	
Jet à l'hélium (99,5%) et oxygène (0,5%)	15 mm	39°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	Microplaques 96 puits	48 h	7,2 log (CFU.mL ⁻¹)	240 s	-7,2	(Flynn et al. 2015)
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram -			6,6 log (CFU.mL ⁻¹)	120 s	-6,6	
			<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram -			6,6 log (CFU.mL ⁻¹)	360 s	-3,9	
			<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram -			6,7 log (CFU.mL ⁻¹)	240 s	-6,7	
			<i>Enterococcus faecium</i>	Gram +			5,7 log (CFU.mL ⁻¹)	240 s	-5,7	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +			7,2 log (CFU.mL ⁻¹)	360 s	-7,2	
DBD dans l'air ambiant	10 mm	28°C	<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Microplaques 96 puits	24 h	5,5 log (CFU.mL ⁻¹)	300 s	-5,5	(Ziuzina et al. 2015)
			<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram -			6 log (CFU.mL ⁻¹)		-4,7	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +			6,5 log (CFU.mL ⁻¹)		-4,3	
Jet à l'hélium (99,5%) et oxygène (0,5%)	ND	39°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	Peg device	48 h	6 log (CFU/picot)	600 s	-6	(Alkawareek et al. 2012b)
			<i>Escherichia coli</i>	Gram -			7 log (CFU/picot)		-7	
			<i>Bacillus cereus</i>	Gram +			240 s	6,5 log (CFU/picot)	-6,5	
			<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +				5,5 log (CFU/picot)	-5,5	
Jet corona dans l'air	10 mm	27°C	<i>Weissella confusa</i>	Gram +	Membrane d'esters de cellulose	48 h, sans saccharose	7,4 log (CFU.cm ²)	30 min	-2,6	(Marchal et al. 2012)
						48 h, avec saccharose	8 log (CFU.cm ²)	30 min	-1,7	
RF à pression haute (AtomFlo 250) avec de l'hélium	70 mm	52°C	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Gram -	Microplaques 96 puits	96h	7 log (CFU.mL ⁻¹)	60 min	-3,5	(Abramzon et al. 2006)
Décharge corona dans l'air	5 mm	ND	<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Lamelles de verres	48 h	6,8 log (CFU.mL ⁻¹)	15 min	-5,4	(Kovalova et al. 2016)
Glidarc à de l'air saturé	22 cm	« 30°C » Re-froissement à 5°C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram +	Coupons en acier	24 h	7 log (CFU.cm ²)	90 min	-7	(Kamgang et al. 2007)
Jet de plasma, air comprimé (KINPen Med)	15 mm	ND	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	Lamelles de verres	48 h	8,7 log (CFU/coupons)	60 min	-2,5	(Helgadóttir et al. 2017)
			<i>Escherichia coli</i>	Gram -			8,7 log (CFU/coupons)		-0,9	
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram +			8,7 log (CFU/coupons)		-0,8	
			<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +			6,7 log (CFU/coupons)		-2,3	

2.2 Les diodes électroluminescentes (LED) dans les ultraviolets C

Depuis plus de 30 ans, les diodes électroluminescentes (LEDs) dans le visible ont connu un développement remarquable et ont trouvé des applications dans les domaines de l'affichage et de l'éclairage. Dans ce dernier domaine, les lampes LED ont remplacées les lampes à incandescence : elles produisent une plus forte luminescence et ont une durée de vie plus longue (20 000 h contre 5 000 h) (Schubert et al. 2015). Le développement des LEDs émettant dans les UV-C est beaucoup plus récent et les premiers prototypes sont apparus dans les années 2010 grâce aux progrès de la technologie des semi-conducteurs.

Nous nous intéresserons dans les paragraphes suivants plus particulièrement aux LEDs UV-C. En effet, l'effet bactéricide des UV-C est largement démontré et quelques travaux présentent cette technologie très récente comme une nouvelle possibilité de traitement d'éradication des biofilms bactériens. Plus largement, ces LEDs UV-C sont très prometteuses pour différentes applications : sources lumineuses pour les microscopes, utilisations médicales et pour des procédés de désinfection et de stérilisation.

2.2.1 Les ultraviolets

Les rayonnements ultraviolets (UV) correspondent à une petite partie du spectre solaire, avec seulement 10% des rayonnements émis par le soleil (Gao and Garcia-pichel 2011; Keklik and Demirci 2014). Les UV sont des rayonnements électromagnétiques correspondant à des longueurs d'onde comprises entre 100 et 400 nm (Figure 20). Ils sont divisés en trois régions : les UV-A (de 315-400 nm), les plus abondants dans l'atmosphère terrestre, les UV-B (280-315 nm) et enfin les UV-C de 100 à 280 nm ; ces derniers étant les plus énergétiques.

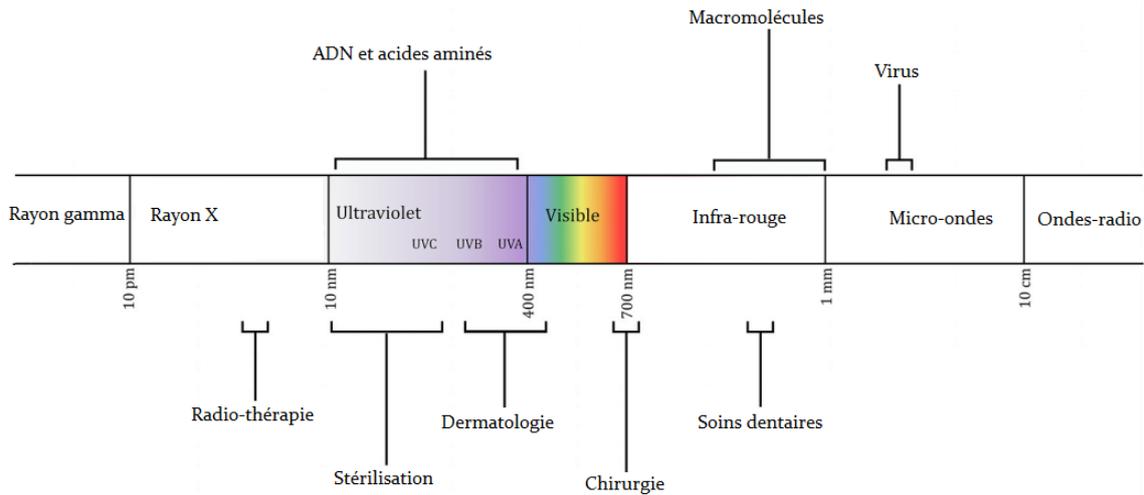


Figure 20 : Représentation du spectre électromagnétique et quelques exemples de domaines d'application (Gwynne and Gallagher 2018)

Contrairement aux UV-A et B, la totalité du rayonnement UV-C solaire est naturellement absorbée par la couche d'ozone. Expérimentalement, différents systèmes permettent de générer des UV-C tels que les lampes à vapeur de mercure à haute et basse pression, les lampes à lumière pulsée (qui ne seront pas développées par la suite) et plus récemment donc des diodes électroluminescentes.

Les photons UV sont absorbés par une large gamme de molécules biologiques, dont l'ADN et les protéines notamment pour les UV-C. Cette absorption entraîne des photo-dommages qui compromettent le bon fonctionnement cellulaire et peuvent conduire à une lyse cellulaire (Gao and Garcia-pichel 2011).

Actuellement, les processus de décontamination utilisent essentiellement des lampes à vapeur de mercure (Bintsis et al. 2000). Une décharge électrique est créée entre deux électrodes dans une enveloppe en quartz remplie de vapeur de mercure. Il existe deux types de lampes à mercure (Figure 21) : les lampes UV à basse pression, appelées aussi « lampes germicides », qui émettent à 254 nm (plus précisément 253,7 nm, spectre d'émission du mercure) et sont donc monochromatiques, et les lampes UV à moyenne pression qui émettent entre 200 et 300 nm et sont donc polychromatiques. Les lampes à basse pression génèrent une température de 30-50°C alors que celles à moyenne pression une température de 600 à 900°C (Keklik et al. 2012). De ce fait, ces dernières sont essentiellement réservées pour le traitement des eaux usées.

Les lampes à vapeur de mercure sont confectionnées en quartz, matériel très fragile, ce qui entraîne un risque environnemental certain du fait de la toxicité du mercure.

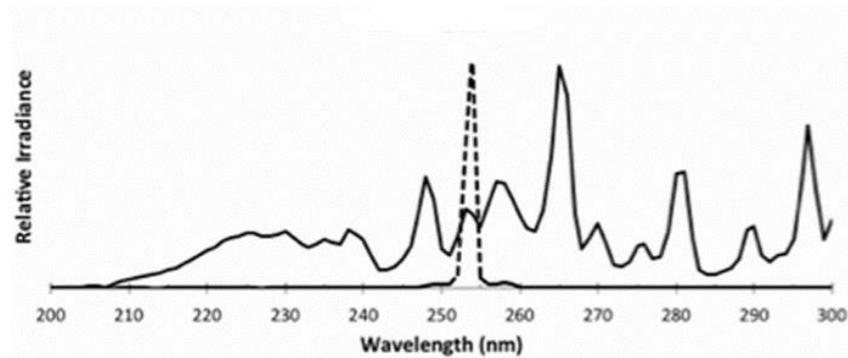


Figure 21: Spectre d'émission des lampes à vapeur de mercure, trait plein : lampe à moyenne pression et pointillé : lampe à basse pression (Beck et al. 2017)

2.2.2 Les diodes électroluminescentes (LEDs)

Les diodes électroluminescentes (LEDs) sont des composants optoélectroniques semi-conducteurs qui convertissent, avec un haut rendement, l'énergie électrique en un rayonnement électromagnétique. Elles se caractérisent par l'émission d'un spectre de longueur d'onde très étroit, quasiment monochromatique.

Les LEDs fonctionnent suivant le principe de l'électroluminescence, la lumière est émise suite au passage d'un courant électrique. Le principe est de produire une zone riche en électrons (matériau dopé type n) et une autre zone avec un déficit d'électrons (matériau dopé type p) ; à la jonction entre les deux matériaux (jonction p-n), les « trous » d'électrons se recombinent avec les électrons et génèrent des photons (Figure 22) (Schubert et al. 2015; Chen et al. 2017)

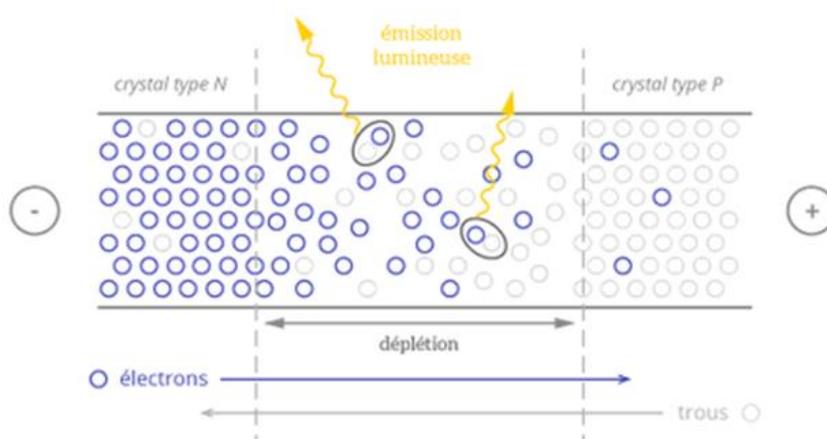


Figure 22 : Principe d'une diode électroluminescente, matériau de type p-n (<http://leclairage.fr/knowledge-base/led/>)

La nature des matériaux semi-conducteurs conditionne la longueur d'onde émise. Dans le cas des LED UV-C, le matériau le plus souvent utilisé est à base de nitrures du groupe III : nitrure de gallium (GaN), nitrure d'aluminium (AlN) ou leur mélange le nitrure de gallium-aluminium (AlGaN) (Chen et al. 2017; Matafonova and Batoev 2018).

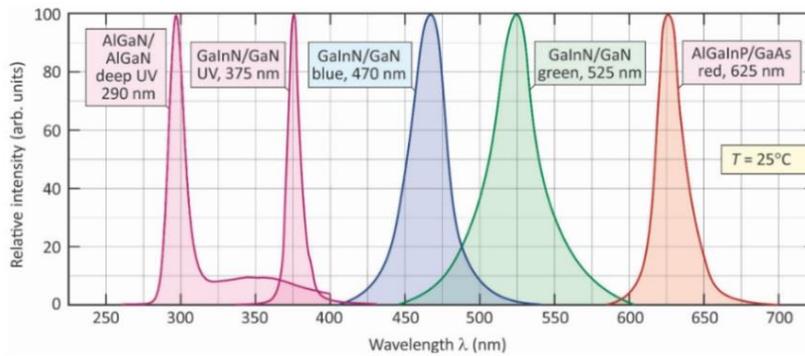


Figure 23: Spectres d'émission de LED selon la composition du semi-conducteur à température ambiante (Schubert et al. 2015)

Ces LED UV-C sont commercialisées par différentes sociétés. Par exemple, Cristal IS (USA), un des leaders dans le développement de cette technologie, a mis sur le marché en 2014, des LED UV-C dont la puissance rayonnée atteint quelques mW, dans une gamme de longueur d'onde de 250 à 280 nm (Chen et al. 2017).

Les LED comportent de nombreux avantages par rapport aux lampes à mercure (Tableau 3). En plus d'être des composants qui ne comportent pas de mercure, elles sont simples d'emploi (pas de temps de préchauffage requis), consomment peu d'énergie (< 1 W), sont utilisables sur batterie, et durent plus longtemps. Tout ceci, en fait une technologie à faible impact environnemental. Le coût reste encore élevé (environ 200 \$/pièce) et leur durée de vie faible (~ 3 000 h), mais des progrès sur ces points devraient rapidement être apportés (Chen et al. 2017). De plus, la très faible taille des modules LED UV, en comparaison des lampes à vapeur de mercure, permet une mise en œuvre dans une plus grande diversité de dispositifs. La perspective de pouvoir 'fibrer' les sources à LED permet également d'envisager l'utilisation des LED UV-C à l'intérieur du corps humain. Enfin, la dose d'exposition aux UV-C peut être ajustée sur une très grande plage, simplement en multipliant le nombre de LED.

Tableau 3 : Comparaison des lampes UV à vapeur de mercure et les LED UV, d'après (Chen et al. 2017)

Paramètre	Lampe à vapeur de mercure	LED UV-C
Teneur en mercure	20-200 mg	Aucune
Temps de préchauffage pour puissance maximale	2-15 min	Aucun
Taille	20 mm (diamètre) x 120 mm (longueur)	~1 mm ²
Architecture	Tube cylindrique	Source ponctuelle
Température de mise en œuvre sur des surfaces	Polychromatique= ~600°C Monochromatique= ~30-50°C	Pas d'augmentation de la température
Composition de la structure	Quartz	Métal ou céramique
Longueur d'onde d'émission	Polychromatique= 200 à 300 nm Monochromatique (95-100% à 254 nm)	Monochromatique, disponible à différentes longueurs d'onde entre 255 à 310 nm
Tension et courant électrique	110-240 V AC et 0,5-2 A	6-30 V DC et 0,02 A
Durée de vie	5 000-12 000 h	3 000h (à 250 nm)

L'importance de renseigner différents paramètres physiques afin de pouvoir comparer les différentes expérimentations entre elles a été soulignée notamment par (Kheyrandish et al. 2017) : 1) la **puissance (intensité) rayonnée** en Watt (W) ou Joule par seconde (J/s), qui mesure la puissance totale du rayonnement électromagnétique ; 2) le **profil de radiation** qui correspond à l'angle de radiation, variable selon l'architecture de la LED, 3) le **flux énergétique** en J.cm⁻², correspondant à l'énergie émise (en mJ) en 1 seconde par cm², 4) la **puissance (intensité) électromagnétique** délivrée par unité de surface ou **irradiance**, en W.m⁻², mesure l'énergie rayonnée par unité de surface, ainsi que 5) la **tension électrique** utilisée. À noter que le terme **dose** correspond à l'énergie reçue par la cible ; elle correspond à l'irradiance multipliée par le temps d'exposition et est exprimée en J.m⁻².

2.2.3 Applications des ultraviolets C pour la décontamination

Le pouvoir germicide des UV-C a été démontré dès 1900 par Niels Finsen sur des lésions tuberculeuses cutanées (*Lupus vulgaris*). Ce n'est qu'à partir des années 1950 que les UV, plus précisément les lampes à vapeur de mercure, ont été utilisées comme système de désinfection de l'eau (Gray 2013). Actuellement, elles sont principalement utilisées pour la **désinfection des eaux** destinées à la consommation, des eaux usées ainsi que pour la décontamination de l'air, de surfaces, d'équipements et d'emballages (Keklik and Demirci 2014).

Dans le **domaine alimentaire**, les lampes à UV-C sont également utilisées pour la désinfection directe d'aliments liquides (jus de fruits) et d'aliments solides (fruits et légumes, viande, œufs, poissons) pour augmenter leur durée de conservation, sans effet sur leurs qualités organoleptiques. L'utilisation des UV pour la stérilisation de jus de fruits est par exemple approuvée par la FDA (U.S. Food and Drug Administration 2000). Certains emballages alimentaires sont aussi stérilisés de cette manière, tels que les papiers, les bouchons et les cartons (Bintsis et al. 2000).

Dans le **domaine médical**, le traitement d'infections localisées a été proposé plus récemment (Dai et al. 2012). Dans ce cas, le temps de traitement doit être très court pour ne pas léser les tissus sains.

2.2.3.1 Les mécanismes d'action des UV-C

Les UV-C ont une **action directe** bien connue sur la molécule d'ADN. Les cycles aromatiques des bases azotées qui constituent l'ADN absorbent l'énergie des photons associés à une longueur d'onde comprise entre 230 et 290 nm, par conséquent dans la zone des UV-C et dans une moindre mesure celles des UV-B. Les UV-C induisent des dommages à l'ADN (et ARN) avec la formation de dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD, *cyclobutane pyrimidine dimer*) et de dimères de pyrimidines en 6-4 (6-4 PP ; *pyrimidine 6-4 pyrimidone*) (Figure 24).

Les CPD sont considérés comme les lésions photo-induites les plus fréquentes (environ 75% CPD contre 25% 6-4 PP) (Sinha and Häder 2002). Ils sont formés par liaisons covalentes de deux pyrimidines adjacentes (surtout TT) en une structure 'cyclique' engageant les carbones C5 et C6 de chaque pyrimidine (d'où le nom de cyclobutane). Il se crée ainsi une distorsion de la double hélice d'ADN d'environ 10° par rapport à sa conformation initiale.

Les 6-4 PP résultent de la liaison entre les positions C6 et C4 de deux pyrimidines adjacentes (surtout TC). Ces lésions entraînent une déformation beaucoup plus importante de la molécule d'ADN, environ 45°. Ces photoproduits peuvent se transformer en isomères de Dewar après une irradiation vers 320 nm (UV-A).

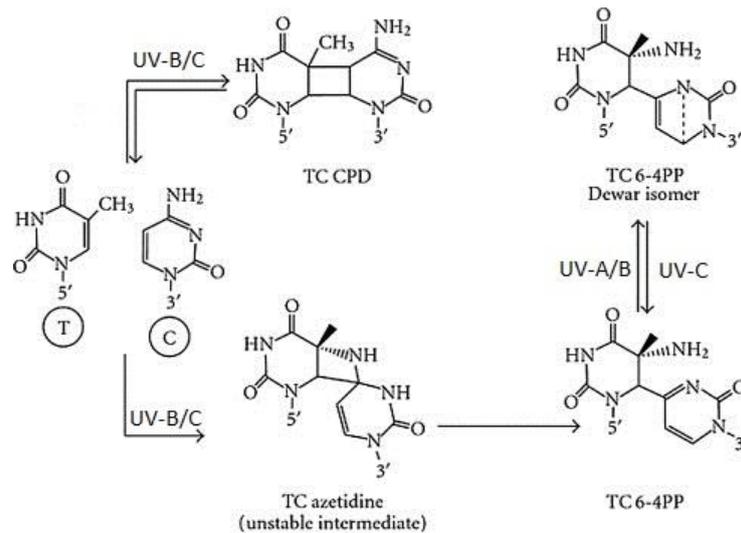


Figure 24 : Formation de lésions de l'ADN après irradiation aux UV- adapté de (Kammeyer and Luiten 2015)

Ces modifications sur l'ADN (et ARN) entraînent un mauvais fonctionnement de la cellule pouvant conduire à la mort cellulaire. En effet, ces distorsions ont des conséquences sur la fixation des protéines qui interagissent avec la molécule d'ADN. Ainsi, les dimères de pyrimidines empêchent la progression des ADN et ARN polymérases, bloquant respectivement les mécanismes de réplication et de transcription. Il suffit d'un seul CPD sur l'ADN non réparé pour bloquer les mécanismes de réplication et de transcription (Sinha and Häder 2002).

Certaines polymérases peuvent cependant contourner la lésion. Dans ce cas, des mutations ponctuelles vont apparaître, dues à l'incorporation d'une base azotée incorrecte en face d'une lésion non réparée (mutations photo-induites).

Les UV-C peuvent également agir **de manière indirecte sur l'ADN** et d'autres macromolécules biologiques (protéines, lipides), comme le font par ailleurs les UV-A (Elasri and Miller 1999). En effet, la photo-oxydation de l'oxygène conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), essentiellement des radicaux hydroxyles (OH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces espèces réactives induisent des oxydations sur différentes bases azotées de l'ADN, notamment la production de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), qui est utilisé comme marqueur du stress oxydatif cellulaire. Ces espèces réactives induisent également des oxydations sur différents acides aminés et une peroxydation lipidique, ce qui entraîne des dommages au niveau des membranes cellulaires (Santos et al. 2013b). Ceci peut donc rendre compte de la mise en évidence d'une perte de l'intégrité membranaire dès 3 min de traitement aux UV-C

(lampe à vapeur de mercure) par cytométrie en flux (marqueurs, fluorescein diacetate « FDA » et propidium iodide « PI ») (Schenk et al. 2011a).

2.2.3.2 Limitations de l'effet bactéricide des UV-C

Mécanismes de réparation des lésions chez les bactéries

Différents mécanismes de réparation des lésions photo-induites sont connus chez les bactéries. En dehors de la période de réplication de l'ADN, deux mécanismes peuvent permettre de réparer l'ADN endommagé : le mécanisme de photo-activation et les mécanismes d'excision-réparation. Le **mécanisme de photo-réversion ou photo-activation** est une réparation des dommages par « inversion » de la lésion grâce à des photo-lyases (CPD lyases et 6-4 photolyases) (Sinha and Häder 2002). Ces enzymes étant activées par l'énergie lumineuse visible, ce mécanisme ne peut avoir lieu qu'en présence de lumière. En ce qui concerne les **mécanismes d'excision**, il s'agit de mécanismes plus complexes de réparation (simple brin) faisant intervenir plusieurs enzymes chargées de reconnaître la zone lésée et d'exciser un nucléotide (BER, *base excision repair*) ou un groupe de nucléotides du brin d'ADN contenant la lésion (NER, *nucleotide excision repair*). Un ou plusieurs nucléotides seront alors incorporés et l'ADN retrouvera une conformation adéquate. Ces mécanismes ne peuvent se produire qu'à l'obscurité, contrairement à la photo-réactivation, d'où son appellation également de « dark repair » (Sinha and Häder 2002; Gayán et al. 2014).

En cas de lésions en nombre très important, les bactéries vont induire une réponse globale dite 'système SOS' pour réparer les dommages de l'ADN par un mécanisme de recombinaison. Ce système implique plus d'une vingtaine de gènes qui ont une régulation coordonnée (sous la dépendance des protéines RecA et LexA) et sont impliqués dans la réplication, la réparation de l'ADN et la division cellulaire (Bichara et al. 2011; Gayán et al. 2014).

Faible pénétration des UV-C dans le milieu

Afin que les micro-organismes soient inactivés, il est nécessaire qu'ils soient atteints par le rayonnement UV-C. Or, celui-ci sera plus ou moins absorbé en fonction du coefficient d'absorption α , spécifique de chaque liquide et défini pour chaque longueur d'onde. Par exemple à 254 nm, ce coefficient est de $0,001 \text{ m}^{-1}$ pour l'eau et de 300 cm^{-1} pour du lait. Muller et al. 2014 ont déterminé qu'une relation entre efficacité d'inactivation et absorbance de la solution existait jusqu'à certaines valeurs d'absorbance (Müller et al. 2014). En effet, une

relation linéaire a été observée entre la dose d'UV-C requise pour inactiver une population d'*E. coli* en fonction du coefficient d'absorption entre 0 et 40 cm⁻¹. Au-delà de cette valeur, l'absorbance ne semble plus avoir d'impact (Junqua 2017).

2.2.3.3 Applications des LED UV-C sur des bactéries planctoniques

L'effet antimicrobien de LED UV-C a été trouvé dans certains cas comparables à celui de lampes à vapeur de mercure. Par exemple, (Sholtes et al. 2016) ont montré que des doses d'UV identiques entre les deux systèmes d'irradiation permettent d'atteindre un effet biocide similaire sur des suspensions d'*Escherichia coli*, des spores de *Bacillus atrophaeus* et des virus MS-2.

Un système LED UV (260 nm) a permis de désinfecter des membranes de stéthoscopes inoculées par des suspensions de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*, avec un taux de réduction compris entre 85% et 95% (Messina et al. 2015).

Par ailleurs, une des premières études sur l'efficacité antimicrobienne des LED UV-C a montré que l'exposition de suspensions bactériennes avec une LED UV-C émettant à 254 nm réduit une population d'*E. coli* de 78% à 99,4% (suivant les 3 souches étudiées) alors qu'elle n'est que de 22,5% à 40% pour des souches d'*Enterococcus faecalis* (2 souches), à une même concentration bactérienne de départ (Chevremont et al. 2012a). Dans cette même étude, l'utilisation d'une LED UV-C émettant à 280 nm a conduit quasiment au même niveau de mortalité pour *E. coli*, mais à une mortalité plus élevée dans le cas d'*E. faecalis* (72% à 100%). Cependant, il est à souligner que les deux LED UV n'avaient pas la même puissance nominale.

Plus récemment, des travaux ont également comparé l'efficacité de LED UV-C émettant à ces deux mêmes longueurs d'onde dans le cas du traitement de jus de fruits inoculés avec une souche d'*E. coli* (Akgün and Ünlütürk 2017). L'utilisation d'un module de 4 diodes à 254 nm (772 mJ.cm⁻²) permet une réduction de 3,6 log₁₀ et celle du module de LEDs à 280 nm (707 mJ.cm⁻²) une réduction de 4,0 log₁₀ en 20 min. Dans le cas d'un jus de fruits beaucoup plus trouble (NTU 360 fois plus élevée), la réduction n'est plus que de 1,1 log₁₀ et 1,6 log₁₀, respectivement, confirmant ainsi la diminution de l'efficacité d'une irradiation UV-C dans le cas d'échantillons riches en matières en suspension (Vilhunen et al. 2009).

D'après la littérature, il apparaît que les résultats d'inactivation sont très variables suivant les études. Ceci peut être mis en relation avec la diversité des paramètres physiques (intensité, irradiance, ...) de l'exposition, qui ne sont d'ailleurs pas toujours renseignés dans leur totalité.

De plus, il est connu que la sensibilité au rayonnement UV-C (et les capacités de réparation) est variable suivant les espèces/souches (Malayeri et al. 2016).

2.2.3.4 Application des LED UV-C sur des biofilms

Très peu de travaux ont été réalisés jusqu'à présent pour le traitement de biofilms par la technologie LED UV-C ; il s'agit de deux études réalisées sur des biofilms de *P. aeruginosa*, résumées dans le Tableau 4.

L'effet biocide d'une LED UV-C (à 265 nm) sur des biofilms d'*E. coli* de 72 heures préalablement formées à l'intérieur de cathéters de 10 cm de longueur a atteint une diminution de 6 log₁₀ de la population bactérienne (Bak et al. 2010).

Sur des biofilms de 24 h de *P. aeruginosa* formés sur membrane d'esters de nitrocellulose (Argyraki et al. 2017) ont mis en évidence un taux de mortalité de 90% avec une LED UV-C à 266 nm. Pour des biofilms de 48 h, les effets observés sont moindres et identiques au témoin non traité.

Tableau 4 : Résumé des publications sur le traitement de biofilms par des LED dans les UV

Longueur d'onde (nm)	Distance (cm)	Intensité (mW.cm ⁻²)	Radiance (mW)	Espèce	Biofilm supports	Temps de formation	Densité initiale	Diminution logarithmique	Dose (mJ.cm ⁻²)	Références
266	1,5	180-1080	/	<i>P. aeruginosa</i>	Membrane d'esters de celluloses	24 h	9,5 log ₁₀	-1 log ₁₀	2 000	(Argyraki et al. 2017)
			/			48 h	10 log ₁₀	0		
265	?	/	0,25	<i>P. aeruginosa</i>	Cathéter en téflon	72 h	~ 6 log ₁₀	-6 log ₁₀	16,6	(Bak et al. 2010)

3 Méthodes d'analyse de l'efficacité anti-biofilms

L'analyse de l'effet des traitements des biofilms passe le plus souvent par la formation de biofilm modèles *in vitro* qui permettent de contrôler un grand nombre de paramètres expérimentaux. À l'heure actuelle, la plupart des études sur l'évaluation d'effets biocides utilisent des méthodes dites à haut débit, avec la formation de biofilms immergés en microplaques (Azeredo et al. 2017). Ensuite, en fonction de l'objectif de l'étude, différentes méthodes peuvent être utilisées pour caractériser les biofilms modèles à différents niveaux (Figure 25) : au niveau de leur biomasse totale (cellules + matrice), au niveau matriciel, et enfin au niveau cellulaire. Différentes méthodes existent pour chacun de ces niveaux d'étude, certaines pouvant être réalisées directement sur le biofilm (analyses *in situ*) et d'autres après détachement du biofilm (analyses *ex situ*). Dans ce dernier cas, l'analyse doit être précédée d'une étape de détachement du biofilm et/ou d'extraction des exopolymères extracellulaires.

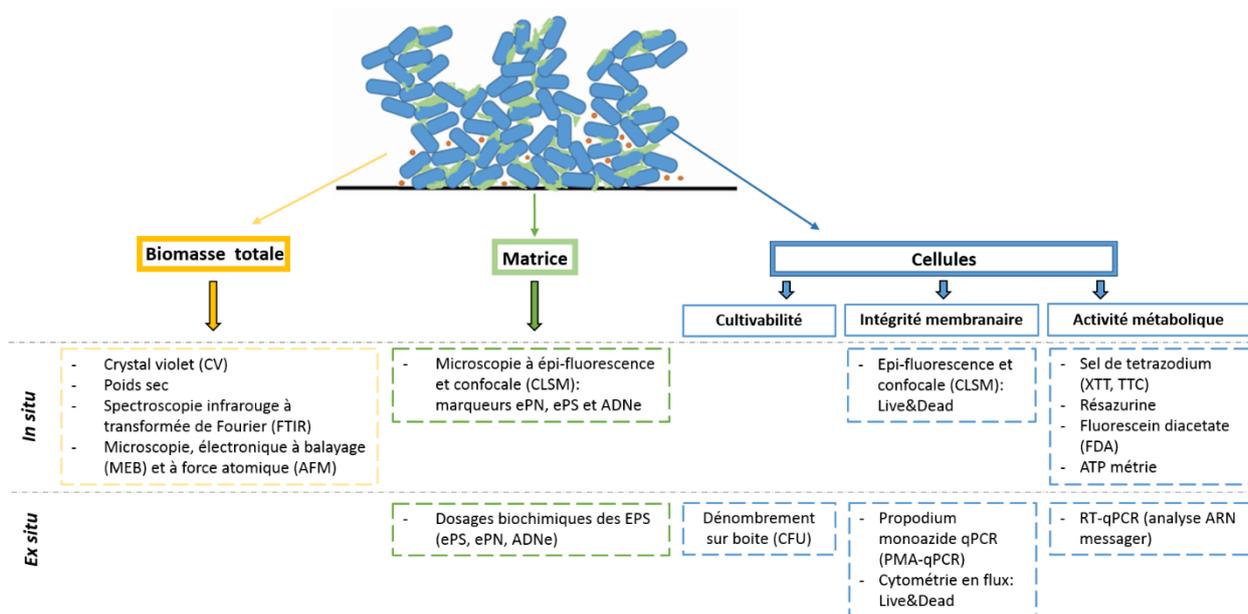


Figure 25 : Méthodes d'analyse des biofilms modèles, adapté (Azeredo et al. 2017)

Parmi toutes les méthodes existantes, certaines apporteront une information qualitative ou semi-quantitative, tandis que d'autres permettront d'accéder à des données quantitatives. Ainsi, il est dorénavant communément admis que pour obtenir une information la plus complète et la plus fiable possible, il convient de combiner différentes méthodes caractérisant

chacun des trois niveaux d'analyse (Figure 25), voire d'appréhender chacun des niveaux par des analyses *in situ* et *ex situ*. (Azeredo et al. 2017)

En ce qui concerne la biomasse totale, l'essentiel des méthodes peut être réalisé *in situ*. Elles permettent soit d'analyser la topologie du biofilm, soit de le quantifier dans sa totalité (Annexe 1). Historiquement, la coloration au crystal violet et la détermination de la masse sèche ont couramment été utilisées, du fait de leur simplicité de mise en œuvre et de leur faible coût. Plus récemment, les techniques de microscopie, qu'elle soit électronique à balayage (MEB), à force atomique (AFM), ou confocale à balayage laser (CLSM), ainsi que la spectroscopie infrarouge (FTIR) ont permis d'apporter des éléments précieux d'analyse des biofilms (Humbert and Quilès 2011; Pantanella et al. 2013; Azeredo et al. 2017; Wilson et al. 2017).

L'analyse des EPS a longtemps été pratiquée *ex situ*, en suivant deux étapes : une étape d'extraction et une étape d'analyse biochimique (Annexe 2). Cependant, il existe une grande diversité de méthodes pour chacune de ces étapes, et les résultats obtenus dépendent de leur choix. C'est la raison pour laquelle la microscopie confocale à balayage laser s'est imposée dans les dernières années comme alternative permettant de limiter les sources de variabilité et les étapes de préparation de l'échantillon, grâce à un marquage *in situ* des différents polymères d'intérêt (Azeredo et al. 2017). Différents marqueurs ciblant les polysaccharides, les protéines ou encore l'ADNe ont ainsi été développés (Annexe 3). Certains de ces marqueurs peuvent également être utilisés pour des analyses *ex situ*, améliorant les dosages colorimétriques classiques en permettant soit une plus grande sensibilité, soit une meilleure spécificité ; c'est le cas par exemple de l'épicoconone pour le dosage des protéines (Randrianjatovo et al. 2015) ou du Picogreen pour le dosage de l'ADN (Randrianjatovo-Gbalou 2016).

Pour l'analyse de la biomasse totale et des EPS, les techniques utilisées dans ce travail seront détaillées dans la partie expérimentale (voir p. 119). En revanche, les analyses portant sur l'étude de la composante cellulaire, qui ont fait l'objet d'un travail expérimental de développement au cours de cette thèse, vont être abordées dans ce chapitre qui détaillera les méthodes utilisées pour analyser la viabilité cellulaire au sein d'un biofilm. Parmi ces méthodes, une attention particulière sera portée sur la PCR de viabilité (v-qPCR ou PMA/EMA-qPCR) et la métabolisation de la résazurine.

3.1 Méthodes d'analyse de la composante cellulaire

Les cellules bactériennes du biofilm sont la cible principale de nombreux traitements anti-biofilms et il est donc important de pouvoir évaluer la perte de viabilité cellulaire en quantifiant la population bactérienne avant et après traitement.

Historiquement, la viabilité cellulaire a été assimilée à la cultivabilité, et la culture sur milieu gélosé en boîte de Pétri a été définie comme la méthode standard pour étudier la viabilité cellulaire (Davis 2014; Emerson et al. 2017). Plus récemment, Hammes et al (2010) ont redéfini la notion de viabilité cellulaire : une cellule viable doit avoir conservé sa membrane cytoplasmique intacte et fonctionnelle, avec présence d'acides nucléiques fonctionnels (pouvant être transcrits et répliqués), et avec une activité métabolique et énergétique (synthèse de composés cellulaires). De plus, lorsque les conditions sont favorables (notamment en nutriments) les cellules peuvent croître et se multiplier (Breeuwer and Abee 2004; Hammes et al. 2010).

Comme il a été énoncé précédemment (voir p. 45) les bactéries au sein du biofilm sont présentes naturellement dans différents états physiologiques. De plus, l'application de traitements anti-biofilm peut conduire non seulement à la mort des cellules mais aussi à l'induction de cellules en état viable mais non cultivable (VBNC), métaboliquement actives et possédant une membrane intègre (Hammes et al. 2010; Davis 2014).

Par conséquent, différentes méthodes doivent être utilisées pour mettre en évidence la viabilité des cellules (selon la définition de Hammes).

La culture et le dénombrement sur milieu gélosé permettent d'accéder aux cellules vivantes, mais peuvent entraîner une sous-estimation puisqu'ils ne permettent pas de prendre en compte les VNBC.

La méthode moléculaire de PCR quantitative (qPCR) permet une détection rapide de l'ensemble des cellules via la détection de leur ADN, mais elle détecte à la fois les cellules vivantes et les cellules mortes ainsi que l'ADN extracellulaire, conduisant dans ce cas à une sur-estimation de la quantité de bactéries présentes. Pour pallier ce problème, la méthode de viabilité qPCR (v-qPCR), basée sur l'intégrité membranaire des cellules, peut être envisagée.

Enfin, la population bactérienne peut être évaluée par des méthodes basées sur l'activité métabolique et énergétique des cellules (Keer and Birch 2003).

Le Tableau 5 présente une liste détaillée des méthodes les plus couramment utilisées pour étudier la viabilité cellulaire, classée selon Hammes. Les paragraphes qui suivent vont détailler plus particulièrement la culture sur boîte (pour l'aspect cultivabilité), la méthode de viabilité qPCR (pour l'aspect intégrité membranaire) et la résazurine (pour l'aspect activité métabolique et énergétique) qui seront plus spécialement mises en œuvre lors de ces travaux de thèse.

Tableau 5 : Méthodes permettant d'évaluer la viabilité au sein d'un biofilm bactérien

Technique	Approche	Matériel	Temps de mise en œuvre	Limites de quantifications (réalisées sur les biofilms)	Avantages	Inconvénients	Références
Méthode basée sur la cultivabilité : étude des VC							
Dénombrement (CFU)	Croissance de cellules sur milieu nutritif	Aucun en particulier	24 à 72 h	NA	- Très sensible - Fiable - Quantitatif	- Ne permet pas de quantifier les VBNC - Non applicable sur les cultures mixtes - Long à réaliser - Sujet aux biais manipulateurs	(Hammes et al. 2010; Davis 2014; Quintas et al. 2014; Azeredo et al. 2017; Olwal et al. 2017; Wilson et al. 2017)
Méthodes basées sur l'intégrité membranaire : étude des VC et VBNC							
Live & Dead (Propidium iodide et SYTO 9)	Marquage des cellules dont la membrane est intègre (Propidium iodide) et des cellules totales (SYTO 9)	- Microscopie fluorescence (CLSM) - Cytomètre en flux - Fluorimètre	Marquage 10 min	10^6 à 3.10^8 CFU.mL ⁻¹	- Rapide - Étude de la distribution spatiale	- Certaines souches ne sont pas marquées correctement - Toxique : perte de viabilité - CLSM : choix d'une zone d'observation pertinente - Photoblanchissement (SYTO 9)	(Peeters et al. 2008; Hammes et al. 2010; Pantanella et al. 2013; Tawakoli et al. 2013; Stiefel et al. 2016; Azeredo et al. 2017; Emerson et al. 2017)
DiBAC4 (3) (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Triméthine Oxonol)	Mesure du potentiel de la membrane cellulaire	Fluorimètre	Environ 2 h	NA : Qualitatif	- Méthode rapide	- Non adéquat aux biofilms pluri-espèces - Perte du potentiel non immédiat après la mort de la cellule - Signal fluorescent influencé par la taille de la cellule - Auto-fluorescence du marqueur - Non réalisé sur biofilm	(Hammes et al. 2010; Okuda et al. 2013)
v-qPCR EMA ou PMA qPCR	- Quantification qPCR des cellules viables seulement - Fixation de l'ADN libre ou des cellules dont la membrane est compromise par les marqueurs EMA ou PMA (les rendant non amplifiables)	- PCR - qPCR - Lampe émettant à 460 nm	10 à 12 h	10^5 à 10^9 CFU.mL ⁻¹	- Applicable sur des biofilms pluri-espèces - S'affranchit de l'ADN extracellulaire	- Méthode relativement couteuse - Choix du marqueur le plus adapté - Turbidité : peut limiter l'étape de photo-activation - Cellules mortes en grandes quantités affectent la quantification	(Nocker and Camper 2009; Davis 2014; Tavernier and Coenye 2015; Azeredo et al. 2017; Emerson et al. 2017)

Technique	Approche	Matériel	Temps de mise en œuvre	Limites de quantifications (réalisées sur les biofilms)	Avantages	Inconvénients	Références
Méthodes basées sur l'activité métabolique et énergétique : étude des VC et VBNC							
Sels de tetrazodium (XTT, MTT, CTC, INT et TTC)	Mesure l'activité des déshydrogénases	- Spectrophotomètre - Fluorimètre	1 à 3 h ; voir 24 h avec le CTC	XTT : Non linéaire pour <i>P. aeruginosa</i> TTC : 10^6 à 10^8 CFU.mL ⁻¹	- Applicable <i>in-situ</i> - Rapide - Méthode haut débit	- Marqueurs toxiques - Non applicable aux biofilms pluri-espèces - Produit insoluble (formazan) - Variation de métabolisation du substrat selon l'état physiologique	(Hammes et al. 2010; Pantanella et al. 2013; Sabaeifard et al. 2014; Stiefel et al. 2015; Azeredo et al. 2017; Lin et al. 2017; Olwal et al. 2017; Wilson et al. 2017)
Fluoresceine diacétate (FDA)	Mesure de l'activité enzymatique (Substrat d'estérasés et protéases)	- Microscopie à fluorescence (CLSM) - Cytomètre en flux - Fluorimètre	Environ 1 h	10^4 à 3.10^7 CFU.mL ⁻¹	- Applicable <i>in-situ</i> - Applicable sur des échantillons opaques	- Photoblanchiment du FDA - pH dépendant - FDA peut s'hydrolyser spontanément - Mauvaise corrélation avec les CFU	(Peeters et al. 2008; Hammes et al. 2010; Quintas et al. 2014; Lin et al. 2017)
Résazurine (PrestoBlue®, AlamarBlue®)	Mesure l'activité des déshydrogénases	- Spectrophotomètre - Fluorimètre	1 à 25h	10^2 à 10^7 CFU.mL ⁻¹	- Peu coûteuse - Non toxique - Bonne corrélation avec les CFU - Méthode à haut débit	- Non applicable sur des biofilms multi-espèces - Variation de métabolisation du substrat - Perte du signal fluorescent possible selon les conditions	(Peeters et al. 2008; Pantanella et al. 2013; Van den Driessche et al. 2014; Azeredo et al. 2017; Lin et al. 2017; Olwal et al. 2017)
ATP métrie bioluminescence	Mesure de la concentration d'ATP	Luminomètre	15 à 30 min	3.10^4 à 3.10^8 CFU.mL ⁻¹	- Rapide - Méthode à haut débit	- Concentration en ATP n'est pas constante - Surestimation avec l'ATP extracellulaire - Méthode coûteuse - Non applicable sur des biofilms multi-espèces - Méthode peu spécifique	(Gracias and McKillip 2004; Hammes et al. 2010; Wilson et al. 2017; Emerson et al. 2017)
Analyse de l'ARN par Reverse Transcriptase qPCR (RT qPCR) - ARN messenger (ARNm) - ARN ribosomal (ARNr)	Étude de l'ARN	- qPCR - Séquençage	10 à 12 h	Non testé sur biofilm	- Applicable sur un grand nombre de souche	- Non applicable sur des biofilms multi-espèces - 80% de perte d'ARNm pendant la préparation de l'échantillon - Peu de corrélation entre la concentration en cellules viables et l'ARNm ainsi que l'ARNr - ARN présent après la mort de la cellule - Méthode coûteuse	(Keer and Birch 2003; Blazewicz et al. 2013; Davis 2014; Emerson et al. 2017)

3.1.1 Dénombrement des cellules viables par culture

La numération des cellules cultivables est réalisée couramment via la méthode du dénombrement bactérien sur milieu de culture gélosé en boîte de Pétri. L'ensemencement de l'échantillon (et de dilutions décimales en série) à la surface du milieu de culture, suivie par le dénombrement après croissance du nombre de colonies bactériennes formées, permet de quantifier le nombre de cellules viables, exprimé en unité formant colonie (CFU.mL⁻¹ ou CFU.cm⁻²).

Cette méthode comporte différents désavantages :

Comme énoncé préalablement, elle ne permet pas de détecter les cellules en état de dormance (VBNC) ce qui conduit à une sous-estimation du nombre de cellules viables (Hammes et al. 2010; Azeredo et al. 2017; Olwal et al. 2017; Emerson et al. 2017).

- Cette méthode est souvent présentée comme longue et fastidieuse à réaliser (Hammes et al. 2010; Azeredo et al. 2017; Olwal et al. 2017).
- Le décrochage des cellules du support est une étape critique de la méthode. Les cellules peuvent le plus souvent être décrochées de leur support de façon mécanique, par grattage ou ultrasons, étape qui peut modifier l'état des cellules. De plus la fraction de cellules décrochées peut être non représentative de l'échantillon initial (Azeredo et al. 2017).

Cependant, cette méthode reste la référence en termes d'évaluation de la viabilité cellulaire, ce pourquoi elle est quasiment systématiquement employée pour définir l'efficacité de tout traitement antimicrobien.

3.1.2 Kit Live & Dead® (Propidium iodide et SYTO 9)

Ce kit est composé des marqueurs fluorescents Propidium Iodide (PI) et SYTO 9 qui permettent de quantifier les cellules lésées non viables et les cellules totales, respectivement. Les résultats obtenus pour les cellules non viables présentent une bonne corrélation avec la méthode de dénombrement classique, mais la méthode demande de travailler à une concentration cellulaire préalablement définie pour chaque souche.

Le marqueur PI est un marqueur rouge-orange fluorescent qui ne peut pénétrer dans la cellule que lorsque l'intégrité membrane n'est plus assurée. Le PI se lie alors à l'ADN intracellulaire en s'intercalant de façon aléatoire toutes les 4 à 5 paires de bases (Stiefel et al. 2015). Lorsqu'il est lié à l'ADN, la fluorescence est 20 à 30 fois plus élevée (Stiefel et al. 2015). À l'inverse, toutes

les cellules sont perméables au marqueur Syto 9, qui se fixe donc aussi bien sur l'ADN des cellules mortes que des cellules vivantes. En plus d'être rapide et fiable, cette technique peut être combinée à une analyse par microscopie à épi-fluorescence, cytométrie en flux ou fluorimétrie (Stiefel et al. 2016; Emerson et al. 2017).

Cependant, le marquage ne fonctionne pas correctement sur certaines souches à Gram négatif (Stiefel et al. 2016; Emerson et al. 2017). Le marqueur SYTO 9 est par ailleurs connu pour blanchir rapidement, avec une perte de 80% de la fluorescence initiale après 130 min (Tawakoli et al. 2013; Stiefel et al. 2015). De plus, il semblerait que le marquage par cette technique induise une perte de viabilité (Tawakoli et al. 2013).

3.1.3 Méthode moléculaire de viabilité qPCR (v- qPCR)

3.1.3.1 Principe des méthodes moléculaires qPCR et viabilité qPCR

La technique moléculaire de réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) a révolutionné la détection et le dénombrement des micro-organismes. En effet, c'est une méthode sensible, spécifique, automatisable, rapide et reproductible permettant de détecter les acides nucléiques (ADN, ARN) au sein d'un échantillon.

La méthode PCR consiste à amplifier *in vitro* une séquence spécifique d'ADN par l'action répétée d'une ADN polymérase qui fonctionne à partir d'amorces (primers) qui encadrent la région d'intérêt. Dans la technique PCR conventionnelle, dite en point final, les fragments d'ADN générés (ou amplicons) sont ensuite mis en évidence de façon qualitative grâce à une électrophorèse en gel d'agarose. La technique de PCR en temps réel, dite également PCR quantitative ou qPCR, permet de quantifier les amplicons au fur et à mesure de leur formation grâce à l'ajout dans le milieu réactionnel de composés fluorescents qui se lient aux amplicons, tel que le SYBR®Green qui se lie spécifiquement à l'ADN double brin. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle d'amplification et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant, proportionnelle à la quantité initiale d'ADN cible dans l'échantillon. La Figure 26 montre différentes cinétiques d'amplification qPCR pour des concentrations d'ADN cible croissantes.

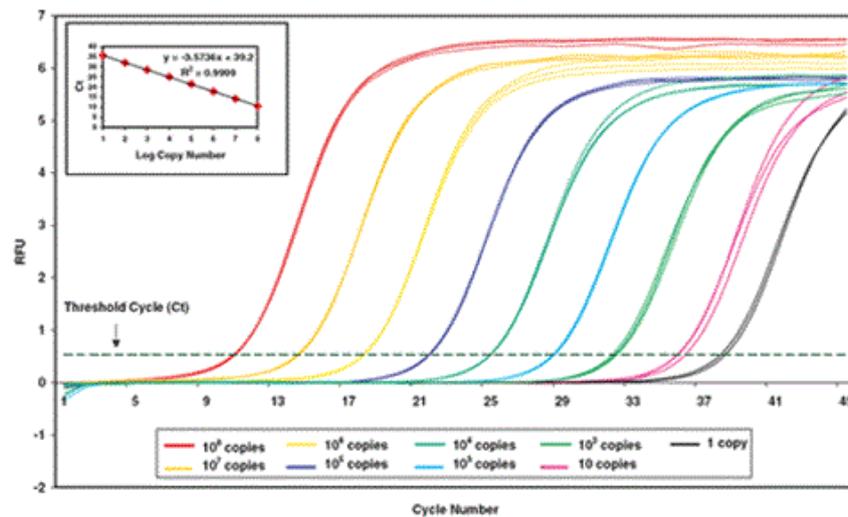


Figure 26 : Amplification en temps réel de concentrations d'ADN cible croissantes. L'intensité de la fluorescence émise est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'encart correspond à la droite d'étalonnage exprimant les variations de Ct en fonction de la quantité d'acide nucléique cible (www.affymetrix.com)

Ainsi, plus l'échantillon est concentré en ADN cible, moins il faudra de cycles d'amplification pour atteindre un point pour lequel le signal de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme étant le Ct, le cycle seuil (Ct pour *Cycle threshold* en anglais, Cq pour cycle quantitative). La détermination des Ct d'une série d'amplification de solution d'ADN de quantité connue (N_0) permet de tracer la droite de calibration $Ct=f(\log_{10}N_0)$, et ainsi de calculer ultérieurement la quantité initiale d'ADN d'un échantillon inconnu (encart de la Figure 26).

Cette technique est appliquée à des solutions d'ADN après son extraction des cellules, et elle ne permet donc pas la distinction entre l'ADN des cellules vivantes et mortes, ni même de l'ADNe (van Frankenhuyzen et al. 2011). Pour remédier à cette limite, une méthode utilisant un prétraitement des échantillons, avant l'étape d'extraction d'ADN, par des agents intercalants de l'ADN tels que l'Ethidium Monoazide (EMA) ou le Propidium Monoazide (PMA), a été développée récemment (van Frankenhuyzen et al. 2011; Fittipaldi et al. 2012). Les marqueurs PMA et EMA ne peuvent pas pénétrer dans les cellules dont le système membranaire est intègre (Figure 27) et sont des composés photoréactifs : sous l'action de la lumière, ils se lient de façon covalente à l'ADN et inhibent son amplification. Ces agents intercalants sont ajoutés à l'échantillon avant l'étape d'extraction d'ADN, permettant ainsi la

suppression de l'amplification de l'ADN extracellulaire et des cellules lésées. Ainsi, seules les cellules viables sont quantifiées, d'où le terme donnée à cette technique de viabilité qPCR (v-qPCR) (Figure 27).

Finalement, en soustrayant le nombre de cellules cultivables, déterminé par dénombrement, au nombre de ces cellules viables, déterminé avec l'approche v-qPCR, il est possible de définir le nombre de cellules VNBC dans un échantillon.

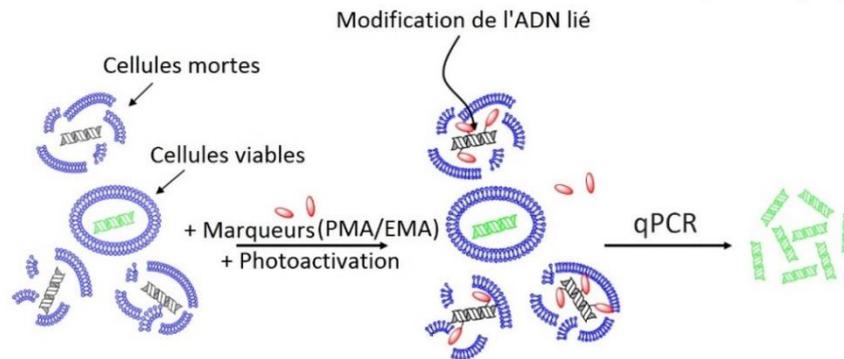


Figure 27 : Méthode PMA et EMA qPCR (d'après le site Biotium.com)

3.1.3.2 Les marqueurs EMA/PMA et leur chimie

L'Ethidium Monoazide (EMA), analogue du bromure d'éthidium, a été le premier intercalant utilisé (Hixon et al. 1975; Nogva et al. 2003). Nocker et son équipe, qui ont largement contribué au développement de la technique de v-qPCR, ont ensuite proposé d'utiliser le propidium monoazide (PMA), analogue du propidium iodide (PI) (Nocker et al. 2006). L'EMA et le PMA se distinguent de leurs analogues respectifs par la présence d'un groupement azide N_3^- , (Figure 28).

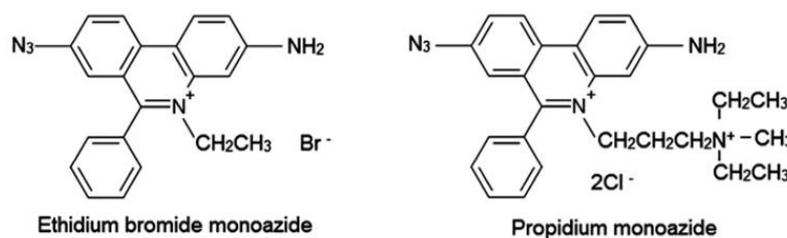


Figure 28 : Structure des intercalant ; EMA et PMA (van Frankenhuyzen et al. 2011)

La stœchiométrie de liaison à l'ADN a été évaluée *in vitro*, pour le marqueur EMA se lie toutes les 10 à 80 pb (Fittipaldi et al. 2012). Cette stœchiométrie n'a pas été évaluée à ce jour pour le

PMA (Fittipaldi et al. 2012) mais elle est généralement considérée comme équivalente à celle du PI, dont le PMA est un analogue ; il est ainsi supposé qu'il se lie à toutes les 4 à 5 pb (Stiefel et al. 2015).

La fixation covalente des marqueurs à l'ADN nécessite une exposition à la lumière à environ 460 nm (PMA : λ excitation = 464 nm, EMA : λ excitation = 458 nm). Cette étape de photo-activation permet de convertir le groupement azide des marqueurs en un radical nitrène très réactif, qui se lie de façon covalente à l'ADN double brin (Figure 29), ce qui conduit à l'inhibition de l'amplification en qPCR (Hixon et al. 1975). Le mécanisme d'inhibition n'est cependant pas totalement connu, et plusieurs hypothèses ont été émises : (i) la liaison agit comme une barrière physique pour l'ADN polymérase empêchant ainsi l'extension des amorces, (ii) la liaison induit une insolubilisation de l'ADN, (iii) la liaison induit un clivage de l'ADN (Fittipaldi et al. 2012; Vondrakova et al. 2018).

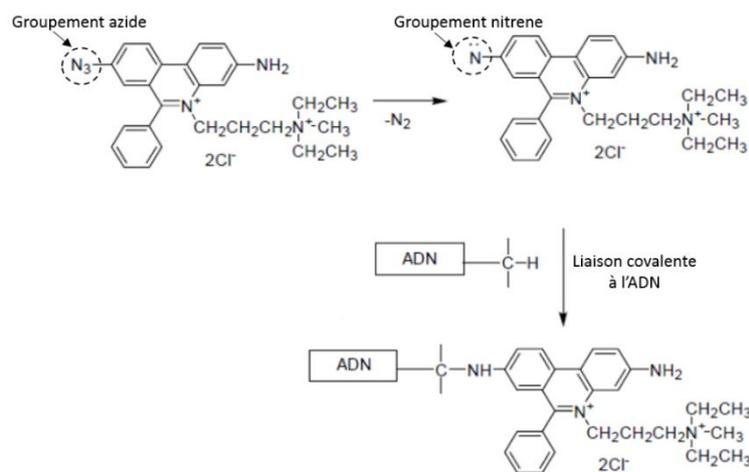


Figure 29 : Liaison covalente du marqueur PMA à l'ADN (d'après le site Biotium.com)

Dans la littérature et dans les fiches techniques des marqueurs, les cellules sont décrites comme étant imperméables aux marqueurs EMA et PMA. Cependant, certaines études ont montré que l'EMA peut pénétrer au niveau intracellulaire dès 5 min de mise en contact chez certaines espèces bactériennes (Nocker et al. 2006; Pan and Breidt 2007; Chen and Chang 2010; Reyneke et al. 2017). Le PMA serait moins pénétrant du fait, semble-t-il, d'une charge positive supplémentaire par rapport à l'EMA (Nocker et al. 2006; Fittipaldi et al. 2012).

3.1.3.3 Paramètres à contrôler pour les applications de l'EMA/PMA vqPCR

Afin d'avoir une application pertinente de l'approche v-qPCR pour l'étude des effets biocides, différents paramètres influant sur les résultats doivent être considérés et parfois optimisés. Ces paramètres dépendent soit des échantillons analysés (turbidité, pH, concentration en cellules mortes, etc.), soit des paramètres du protocole de la v-qPCR (durée d'incubation des marqueurs, concentration des marqueurs, étape de photoactivation, etc.). Les principales étapes clés de cette approche sont résumées dans la Figure 30 avec leurs paramètres attendants et dont certains vont être un peu plus détaillés ci-dessous.

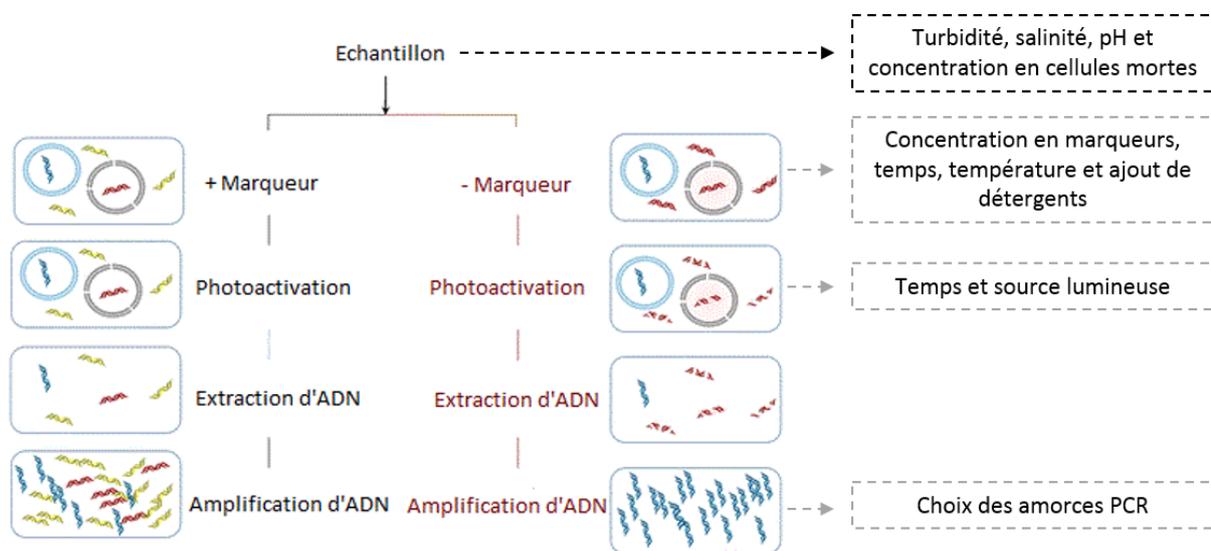


Figure 30 : Étapes de l'approche v-qPCR et les différents paramètres pouvant varier adapté de (Emerson et al. 2017)

⇒ Des concentrations élevées de **cellules mortes** peuvent induire une surestimation de la quantification des cellules viables. Il a été montré que lorsque la concentration en cellules mortes est supérieure à 10^4 unités génome.mL⁻¹, le marquage au PMA ne permet pas de lier tout l'ADN des cellules mortes (Slimani et al. 2012). De plus, comme l'illustre la Figure 31, le rapport entre le nombre de cellules vivantes et de cellules mortes peut avoir une influence sur les performances de la PMA-qPCR. (Slimani et al. 2012). Cette même conclusion a été retrouvée dans diverses publications (Pan and Breidt 2007; Schmidlin et al. 2010; Løvdaal et al. 2011). L'influence des cellules mortes sur le signal v-PCR n'est pas clairement élucidée à ce jour.

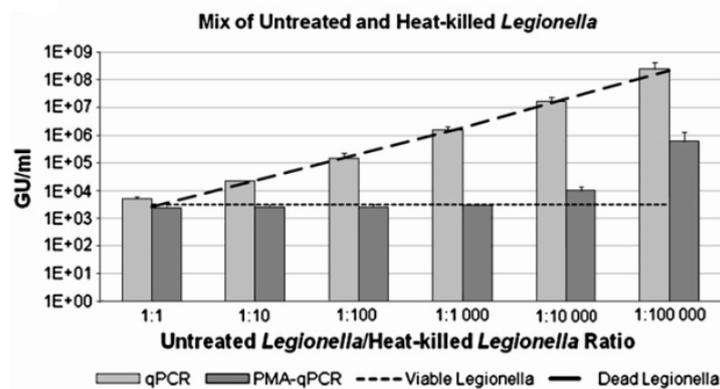


Figure 31 : Influence des cellules mortes de *L. pneumophila* sur la quantification des cellules viables *L. pneumophila* en PMA qPCR (Slimani et al. 2012)

- ⇒ **Concentration du marqueur.** Les concentrations en PMA ou EMA utilisées sont très variables selon les études, et sont comprises entre 2 à 250 μM (Pan and Breidt 2007; Yasunaga et al. 2013; Seinige et al. 2014; Reyneke et al. 2017). Cependant, comme l'EMA peut entrer de façon non spécifique à l'intérieur des cellules viables et possède une certaine toxicité pour les cellules à forte concentration, il est principalement utilisé à une concentration finale de 2,5 μM à 50 μM . (Pan and Breidt 2007; Yasunaga et al. 2013).
- ⇒ **Durée de mise en contact du marqueur.** Le temps d'incubation des marqueurs avec l'échantillon varie de quelques secondes à 60 minutes selon les études, mais la durée la plus fréquemment appliquée est de 5 min de mise en contact (Fittipaldi et al. 2012). Cette incubation se déroule dans le noir et à des températures variables suivant les études (Soejima et al. 2008; Soejima et al. 2011; Fittipaldi et al. 2012).
- ⇒ **Dispositif et durée de photo-activation.** La plupart des études utilisent des lampes halogènes (500-750 W) permettant de balayer la longueur d'onde d'excitation du PMA ou de l'EMA. L'utilisation de ces lampes entraînant une émission de chaleur, certains auteurs réalisent la photo-activation en ajustant la distance entre la source lumineuse et l'échantillon et/ou en maintenant les tubes dans la glace (Chen and Chang 2010; Yasunaga et al. 2013; Álvarez et al. 2013; Vondrakova et al. 2018). Le développement plus récent de LED émettant dans une bande de longueur d'onde plus étroite, aux alentours de 465 nm, permet d'éviter ces inconvénients des lampes halogènes (Tavernier and Coenye 2015; Quijada et al. 2016; Luo et al. 2017). Quelques systèmes spécifiquement dédiés à la v-qPCR

sont d'ailleurs déjà commercialisés (LED PMA-Lite™ (Biotium), PhAST Blue (NeuTec)), mais ils sont encore peu utilisés dans la littérature du fait, semblerait-il, de leur coût élevé.

En ce qui concerne la durée de cette étape, la liaison covalente carbone-azote entre le PMA/EMA et l'ADN se formant rapidement, la durée de photo-activation est souvent courte, comprise entre 2 et 20 min (Fittipaldi et al. 2012).

⇒ La **taille de l'amplicon**. Plusieurs études indiquent que le choix d'amorces permettant de générer des amplicons de grande taille (> 300 pb) permet de limiter la formation de faux positifs, c'est-à-dire l'éventuelle amplification de l'ADN de cellules mortes (Soejima et al. 2008; Contreras et al. 2011; Soejima et al. 2011; Schnetzinger et al. 2013). En effet, l'augmentation de la taille de l'amplicon permet d'augmenter la probabilité de dommages de l'ADN induits par sa liaison avec l'EMA/PMA et ainsi d'augmenter l'inhibition de son amplification lors de l'étape de qPCR. Par exemple, les résultats de l'équipe de Soejima présentés dans la Figure 32 montrent que le niveau de réduction du signal en EMA qPCR sur différentes souches d'entérobactéries mortes varie considérablement en fonction de la taille des amplicons (taille comprise entre 110 pb et 2840 pb) (Soejima et al. 2011). Cependant, il convient de souligner que l'amplification de longs fragments (> 300-400 pb) diminue l'efficacité de la qPCR.

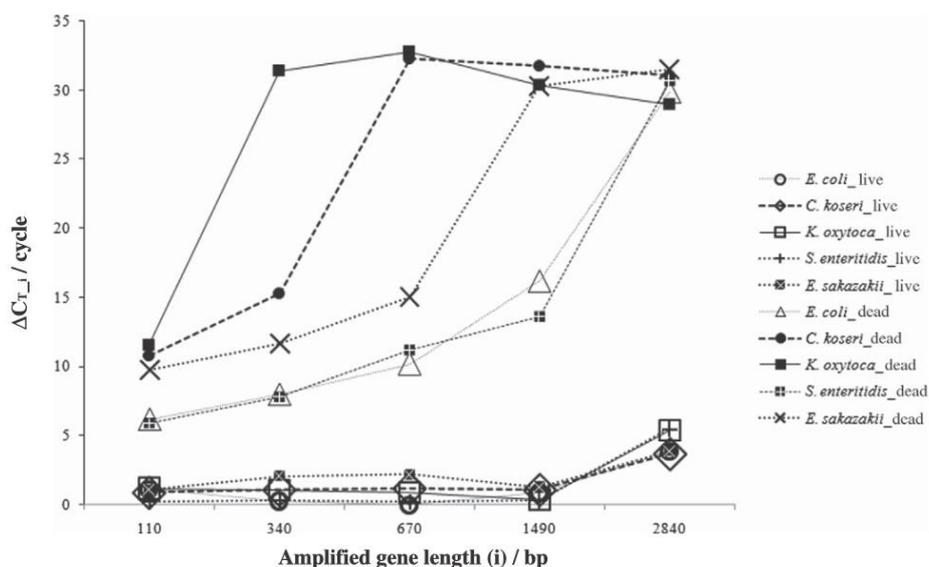


Figure 32 : Réduction du signal en EMA qPCR en fonction des différentes tailles d'amplicons générés (Soejima et al. 2011)

3.1.3.4 Application de la viabilité q-PCR sur biofilms

La v-qPCR est couramment appliquée pour quantifier les cellules viables de bactéries pathogènes dans différentes conditions de stress environnemental et notamment de traitements biocides (Fittipaldi et al. 2012; Rizzotti et al. 2015; Vondrakova et al. 2018).

La grande majorité des études concernent cependant des bactéries sous forme planctonique et à ce jour très peu de travaux l'ont mise en œuvre dans le cas de biofilms bactériens (Yasunaga et al. 2013; Álvarez et al. 2013; Tavernier and Coenye 2015; Luo et al. 2017).

Dans le cadre des biofilms, le marqueur PMA est essentiellement utilisé, avec des performances variables en termes d'estimation de la viabilité. En effet, Slimani et collaborateurs ont montré que le PMA était adapté pour diminuer l'amplification de l'ADN de cellules lésées de *L. pneumophila* ; cependant, lors d'applications à des cellules déposées sur membranes à forte densité cellulaire, ces auteurs ont montré une surestimation des cellules viables. Ces résultats ont été confirmés lors d'une étude sur les effets de différents désinfectants chimiques sur un biofilm de *Legionella* : Taylor et ses collaborateurs ont conclu que la PMA-qPCR n'était pas adaptée pour différencier les cellules vivantes et mortes et donc quantifier *Legionella* (dans un objectif de respect de la réglementation), soulignant notamment l'importance de la concentration du marqueur (Taylor et al. 2014).

En revanche, la PMA qPCR a permis de souligner la plus grande résistance de biofilms de *Streptococcus mutans* à un traitement à l'eau oxygénée, par rapport aux cellules planctoniques (Yasunaga et al. 2013). La PMA-qPCR a également été utilisée pour évaluer l'effet bactéricide de différents antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa* (Tavernier and Coenye 2015). Ces auteurs ont pu mettre en lumière une différence de sensibilité de la souche lorsqu'elle était cultivée sous forme de biofilms mono-espèce ou de biofilms pluri-espèces. Cependant, ils ont également observé que la densité cellulaire ne devait pas être inférieure à 10^5 cellules.mL⁻¹ pour que la méthode soit fiable. Enfin, plus récemment, Luo *et al.* 2017 ont pu montrer la capacité biocide de peptoides (des peptidomimétiques) sur des biofilms bactériens et fongiques mono-souches ou pluri-espèces grâce à cette méthode (Luo et al. 2017).

Ces différents travaux sur cellules déposées sur membranes ou biofilms soulignent l'importance de la maîtrise des paramètres expérimentaux (concentration cellulaire et concentration du marqueur notamment) pour l'obtention de résultats quantitatifs de viabilité pouvant être comparés à ceux de dénombrement sur boîte.

3.1.4 Méthode basée sur l'activité métabolique - Résazurine

Les méthodes d'évaluation de l'activité métabolique reposent généralement sur la conversion biologique d'un substrat spécifique (coloré ou non) en un produit coloré ou fluorescent mesurable directement au moyen d'un spectrophotomètre ou d'un fluorimètre. Seule l'ATP-métrie est basée sur un phénomène de luminescence (Tableau 5). Parmi les substrats couramment employés pour la mesure de l'activité métabolique, il convient de citer les sels de tétrazolium ou encore la résazurine (Tableau 5). Les premiers, et notamment les composés XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride) et CTC (5-Cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride), présentent l'inconvénient d'être toxiques pour les cellules aux concentrations utilisées pour les tests de viabilité. La résazurine (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3 one 10-oxide) est un composé non-toxique, stable, bon marché et facile d'utilisation (Rampersad 2012; Van den Driessche et al. 2014).

Historiquement, la résazurine a été employée afin d'évaluer la qualité du lait (Ramsdell et al. 1935). Depuis une cinquantaine d'années, elle est également utilisée pour étudier la viabilité cellulaire de différents systèmes biologiques (eucaryotes et procaryotes) (Rampersad 2012; Skindersoe et al. 2015).

3.1.4.1 Chimie de la résazurine

La résazurine (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3 one 10-oxide) est un indicateur d'oxydoréduction de couleur bleue, non fluorescent, qui est métaboliquement réduit de façon non réversible en un composé rose fluorescent, la résorufine (Figure 33) (Mariscal et al. 2009). La résazurine joue un rôle d'accepteur d'électrons et peut-être réduite par différentes déshydrogénases intracellulaires (enzymes associées à différentes coenzymes : NADPH, NADH, FMNH, FADH et le cytochrome C) (Mariscal et al. 2009; Rampersad 2012; Chen et al. 2018). La résorufine est ensuite relarguée dans le milieu, et son apparition peut ainsi être quantifiée par colorimétrie (570 nm) ou par fluorimétrie (λ excitation : 570 nm/ λ émission : 590 nm). Cependant, en fonction des conditions d'utilisation (notamment la durée d'incubation, le pH ou la présence de réducteurs), la résorufine peut également être réduite en un composé incolore et non fluorescent, la déshydrorésorufine (Figure 33) (Mariscal et al. 2009; Rampersad 2012).

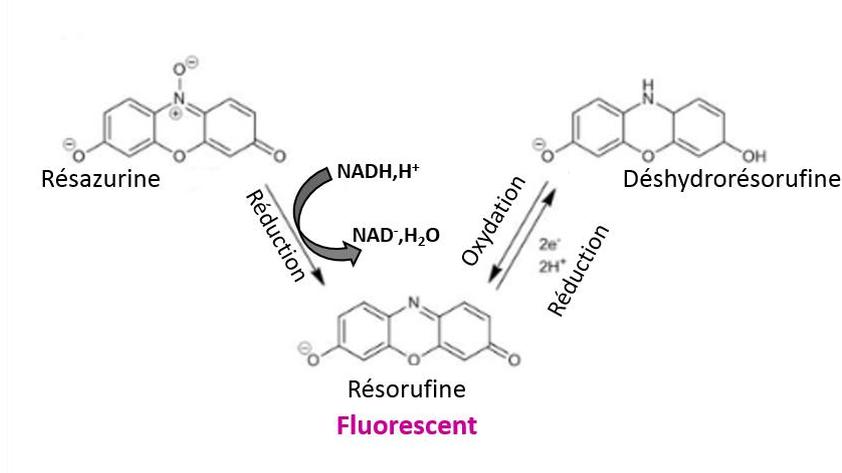


Figure 33 : Conversion de la résazurine en résorufine et déshydrorésorufine

Les propriétés de fluorescence et d'absorbance de la résazurine et de la résorufine sont également étroitement liées au pH. Ainsi, la résazurine est inventoriée comme indicateur coloré (Haynes 2011), la molécule présentant une couleur bleue aux pH supérieurs à 6,8 et rouge aux pH inférieurs à 5,3. De la même façon, la molécule de résorufine est de couleur rouge aux pH supérieurs à 6,8 et orange aux pH inférieurs à 4,8 (Min and Kang 2011). De plus, la variation de pH induit une modification de l'émission de fluorescence maximale de la résorufine (Ryder et al. 2003).

Les molécules de résazurine et de résorufine sont solubles dans l'eau et dans les milieux de culture contrairement à certains formazans produits par exemple par les sels de tétrazolium MTT, TTC. Cette solubilité permet de réaliser des cinétiques d'apparition du produit en temps réel (Berridge et al. 2005).

Des kits commerciaux à base de résazurine ont ainsi été développés (CellTiter-Blue® - Promega, AlamarBlue® - Life Technologies, In Vitro Toxicology Assay Kit - Sigma-Aldrich) pour l'évaluation de la viabilité cellulaire. Il est à noter que la concentration en résazurine dans le réactif varie entre les différents kits et que des adjuvants peuvent être présents, notamment pour maintenir le potentiel d'oxydoréduction du milieu et limiter une réduction chimique de la résazurine.

3.1.4.2 Paramètres à contrôler lors de l'essai résazurine

Dans la littérature, l'essai à la résazurine a été fréquemment utilisé, mais différents paramètres varient entre les études et peuvent rendre difficile la comparaison des résultats : le mode de

lecture du signal (fluorescence ou absorbance), le temps d'incubation, et la concentration du marqueur.

⇒ **Mode de lecture de la réponse.** Dans la littérature, l'absorbance à 570 nm a beaucoup été utilisée pour évaluer la réduction de la résazurine, et ce même dans des travaux récents. Cependant, du fait notamment de la plus grande sensibilité de réponse en fluorescence (λ excitation comprise entre 530 et 570 nm, et λ émission = 590 nm), ce mode de détection est de plus en plus utilisé (Riss et al. 2013; Van den Driessche et al. 2014; Vandecandelaere et al. 2016). Perrot et al. 2003 ont déterminé que les conditions optimales de mesure fluorimétrique sont à une excitation de 570 nm et une émission à 590 nm (Perrot et al. 2003). De plus, à 590 nm l'émission de fluorescence de la résazurine est négligeable, ce qui permet de s'affranchir du signal de la molécule non métabolisée, Figure 34.

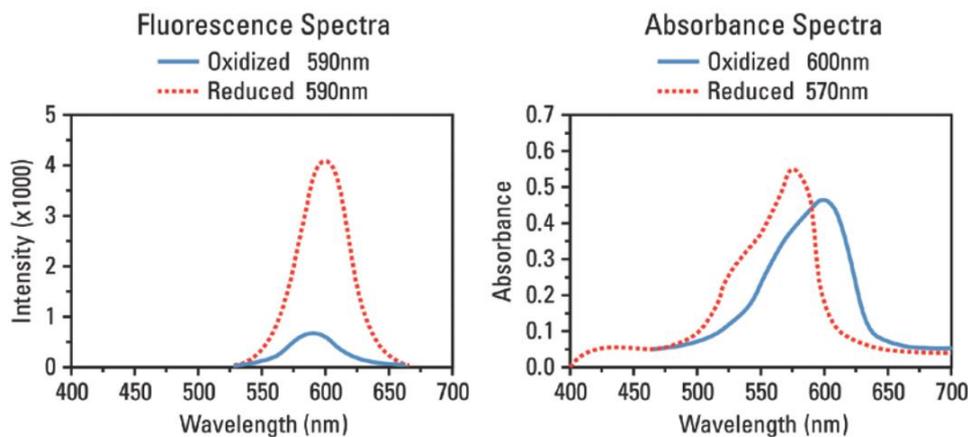


Figure 34 : Spectres d'émission de fluorescence et spectres d'absorbance des molécules de résazurine (molécule oxydée) et de résorufine (molécule réduite) (Fiche technique ThermoFisher Scientific, AlamarBlue™ Cell Viability Assay Reagent)

⇒ **Temps d'incubation.** Le temps d'incubation nécessaire à l'obtention d'un signal fluorescent significativement différent du blanc dépend de l'espèce bactérienne étudiée et de son activité métabolique, de la concentration cellulaire ou encore de la composition du milieu (Riss et al. 2013). Ainsi, (Jiang et al. 2011) ont montré que pour une même concentration cellulaire, la fluorescence atteinte après 2 heures était plus élevée pour *Streptococcus mutans* que pour *Enterococcus faecalis*. Avec un suivi cinétique d'apparition de la fluorescence, (Mariscal et al. 2009) ont montré que le maximum de fluorescence de la

résorufine apparaît après des temps de culture variables pour des souches d'*E. coli*, *Enterococcus hirae*, *Morganella morganii*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Figure 35).

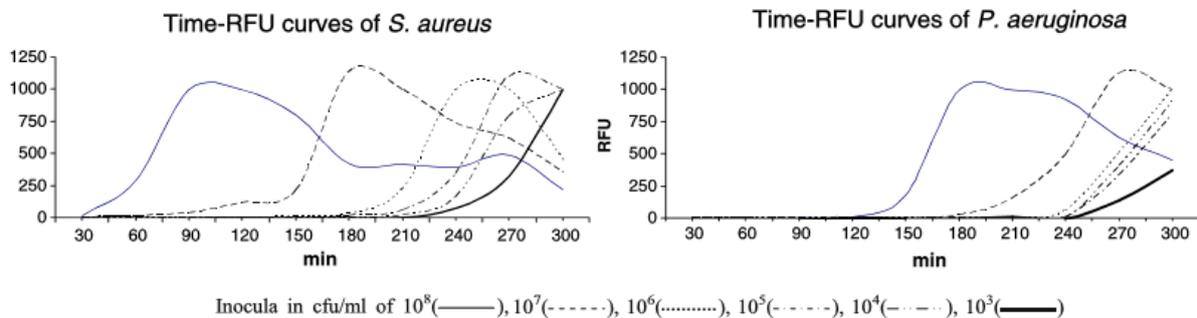


Figure 35 : Cinétiques d'apparition de la fluorescence (RFU) au cours du temps en fonction de la densité cellulaire pour des cultures planctoniques de *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Mariscal et al. 2009)

⇒ **Concentration du réactif** : les concentrations en résazurine utilisées sont variables en fonction des études, mais elles sont généralement comprises entre 20 et 800 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Tableau 6). Ceci est en partie dû à l'utilisation fréquente de l'AlamarBlue® dans les conditions commerciales, correspondant à une concentration de 44 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'après les travaux de (O'Brian et al. 2000). À ces concentrations, aucune toxicité du réactif sur les espèces bactériennes n'est généralement observée. Peu d'auteurs ont spécifiquement évalué la toxicité du réactif, mais il a été montré qu'une concentration de 44 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ n'est pas toxique pour des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Schmitt et al. 2013). En revanche, ces auteurs ont observé à cette concentration une inhibition de croissance pour *Neisseria gonorrhoeae* et *Francisella tularensis*. Enfin, (Sandberg et al. 2009) ont comparé quatre concentrations entre 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 2 mmol.L^{-1} et ont montré que la plus faible concentration donnant des résultats optimaux était de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Tableau 6: Conditions d'utilisation d'un essai à la résazurine pour la quantification de cellules planctoniques ou de biofilms

Auteurs	Objet étudié				Essais résazurine			Mesure			
	Espèce	Suspension (µL)	Biofilm	Concentration cellulaire (CFU.mL ⁻¹)	Milieu	[RZ] finale (µmol.L ⁻¹)	Produit	λ _{ex} (nm)	λ _{em} (nm)	Durée	Pas de temps
(Akinbobola et al. 2017)	<i>P. aeruginosa</i>	pellet	24 puits	~1.10 ⁸	LB	44	10% AlamarBlue	570	595	6 h	
(Augustin et al. 2004)	<i>P. aeruginosa</i>		plaque	10 ³ à 10 ⁷	Iso Senistest Broth	24	Résazurine	544	584	12 h	
(Günther et al. 2017)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i>		96 puits	10 ² à 10 ⁷	TS + LTHTh	797	Résazurine	620	/	7h à 10 h	
(Van den Driessche et al. 2014)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. morgani</i>	50	96 puits	10 ² à 10 ⁸	Mueller Hinton		CellTiter-Blue	535	590	20 h	5 min
(Mariscal et al. 2009)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. morgani</i>		coupons	10 ³ à 10 ⁸	TS (dilué en eau physiologique 1/10)	1/125 (v/v)	In Vitro Toxicology Assay Kit	520	590	6 h	15 min
(Alonso et al. 2017)	<i>S. aureus</i>		96 puits		TS	199,2	Résazurine	570 et 590	/	2 h	
(Dalecki et al. 2016)	<i>S. aureus</i>		96 puits		CRPMI	68,1	Résazurine	530	590	24 h	
(Doll et al. 2016)	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>S. aureus</i>		coupons		PBS	39,8	Résazurine	530	590	30 et 90 min	
(Sandberg et al. 2009)	<i>S. aureus</i>		1 to 24 h	2,8.10 ⁴ à 2,8.10 ⁸	TS	2 à 2000 puis 20	?	570	590	20 min	ND
(Bosso André et al. 2018)	<i>S. mutans</i>		coupons		TS + 3% saccharose	44	10% Alamar Blue	585	/	1 h	
(Jiang et al. 2011)	<i>S. mutans</i> , <i>E. faecalis</i>	180	Système Calgary	10 ⁵ à 10 ⁸	BM sans extrait de levure	63,7	Résazurine	485	585	2 h	
(Jung et al. 2017).	<i>L. mesenteroides</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. plantarum</i>						Résazurine			2, 4, 6, et 8 h	
(Chen et al. 2018)	<i>E. faecalis</i>	300			BHI	99,6	Resazurin	530	590	30 min	2 min
(Skindersoe et al. 2015)	<i>H. pylori</i>		96 puits	~5.10 ⁴ à 5.10 ⁷		26,4	6% AlamarBlue	544	590	1–2 h	ND

⇒ **pH** : comme énoncé précédemment, différentes études ont permis de mettre en évidence l'effet du pH sur l'absorbance et la fluorescence de la résazurine. Ainsi, l'absorbance à 600 nm de la résazurine diminue d'un facteur 6 entre des valeurs de pH de 6,0 et 4,0 tandis que la perte de signal est beaucoup moins marquée pour la résorufine (Zare 2016). De la même façon, lors d'une étude comprenant les bactéries lactiques *Leuconostoc mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum*, les auteurs ont émis l'hypothèse que la résazurine ne peut être utilisée pour ce type de bactérie du fait de l'acidification du milieu due à la production d'acides organiques (Jung et al. 2017). Enfin, outre le pH, certains composants du milieu de culture peuvent aussi impacter la réduction de la résazurine : c'est le cas notamment pour l'acide ascorbique qui réduit la résazurine (Natto et al. 2012).

3.1.4.3 Application aux biofilms modèles mono-espèces

Le développement de l'essai à la résazurine à des fins de quantification de cultures bactériennes a d'abord été réalisé sur des cellules planctoniques, indiquant que la réduction de la résazurine est proportionnelle au nombre de cellules cultivables. Ainsi, (Jiang et al. 2011) ont établi une corrélation entre la réponse en fluorescence de la résazurine et les UFC pour des cultures de *Streptococcus mutans* et d'*Enterococcus faecalis* sur une gamme de densité cellulaire de 1.10^5 à 2.10^8 UFC.mL⁻¹, de même que (Skindersoe et al. 2015) ont obtenu une droite de corrélation pour *Helicobacter pylori* pour des concentrations allant de 5.10^6 to 1.10^8 UFC.mL⁻¹. Cependant, ces travaux, réalisés par mesure en point final après 1 à 8 heures de culture, ont également montré la faible étendue de la gamme de concentration cellulaire pour laquelle les UFC et la réduction de la résazurine sont corrélées, ce qui constitue un frein à l'application de l'essai pour des biofilms dont la densité peut être élevée.

De plus, à une même concentration cellulaire, la métabolisation de la résazurine varie en fonction des espèces bactériennes (p. 94) (Figure 35). Ces résultats ont été confirmés lors d'une application de l'essai à la résazurine sur des biofilms de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* et *C. albicans* (Van den Driessche et al. 2014) (Figure 36). Dans ces deux travaux, il est apparu que *P. aeruginosa* semble peu active métaboliquement dans la mesure où le temps nécessaire pour atteindre le maximum de fluorescence était compris entre 7 et 18 heures pour des concentrations cellulaires de 10^7 à 10^2 UFC.mL⁻¹. Ainsi, dans le cas d'une lecture de la fluorescence en point final, ces variations de réponse dépendant de l'espèce imposent de

déterminer au préalable le temps de réaction adéquat pour les souches étudiées, comme recommandé par (Vandecandelaere et al. 2016).

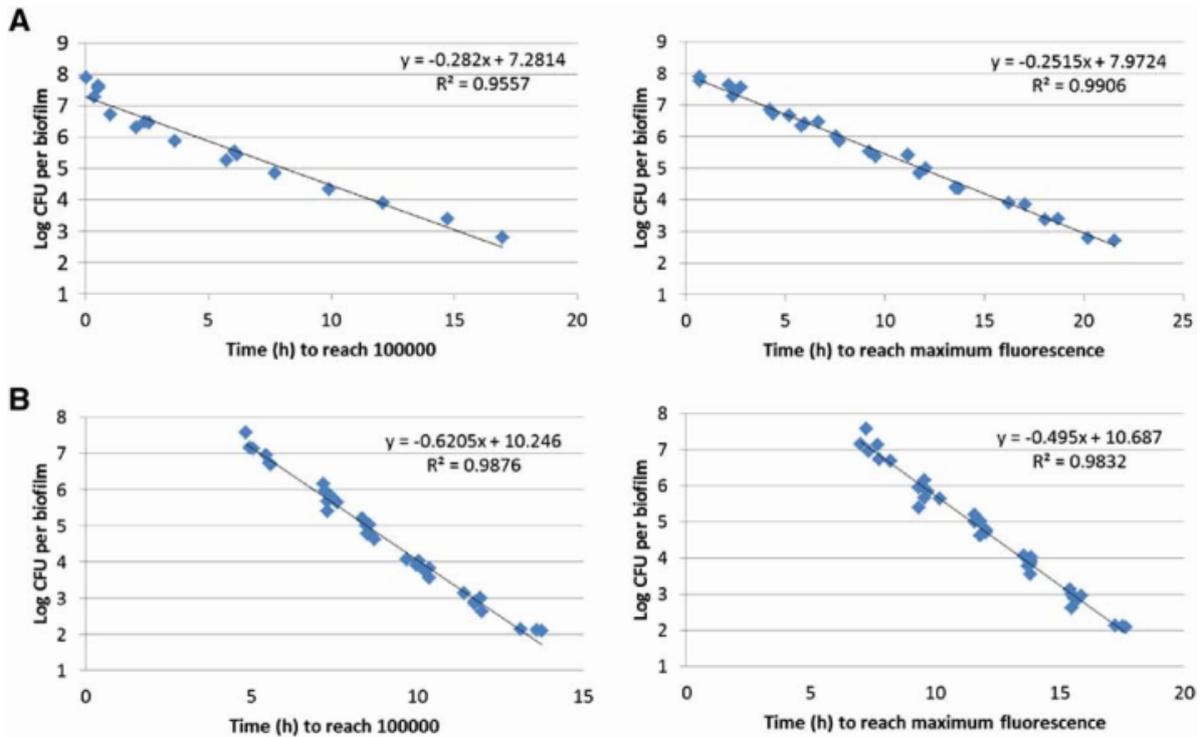


Figure 36 : Courbes de calibration de quantification cellulaire des biofilms (\log_{10} d'UFC) en fonction du temps permettant d'obtenir une fluorescence à 100 000 RFU (graphiques de gauche) ou du temps nécessaire pour atteindre le maximum de fluorescence (graphiques de droite); A) Sur la souche *Staphylococcus aureus* et B) *Pseudomonas aeruginosa* (Van den Driessche et al. 2014)

Enfin, lors de travaux visant à transposer l'essai à la résazurine pour la quantification de biofilms de *S. aureus*, (Sandberg et al. 2009) ont obtenu des intensités de fluorescence différentes après 20 minutes pour des cultures planctoniques et des biofilms de même densité cellulaire. Ces auteurs ont alors conclu à l'inadéquation d'une calibration à partir de cellules planctoniques pour quantifier les cellules d'un biofilm.

Cependant, il n'existe pas, à notre connaissance, d'autres travaux ayant comparé des cellules d'une même espèce sous différents états physiologiques, et de nombreux travaux récents ont appliqué un test à la résazurine pour l'évaluation de l'effet antimicrobien de biocides sur des biofilms mono-espèces développés en microplaques (Tableau 6). Dans la plupart de ces travaux, l'évaluation des effets est calculée en comparant la réduction de la fluorescence par rapport à un groupe témoin et un protocole visant à normaliser les essais d'évaluation de l'action biocide sur des biofilms immergés formés en microplaques a été proposé.

Toutefois, un point limitant pour ces applications reste la limite de détection pour les faibles concentrations cellulaires. Dès 2009, les travaux de (Mariscal et al. 2009) avaient montré qu'en réalisant l'essai en milieu de culture et en faisant un suivi de la fluorescence sur cinq heures, un signal pouvait être mesuré pour des souches de *E. coli*, *E. hirae*, *M. morgani* et *P. aeruginosa* (mais pas pour *S. aureus*) pour des concentrations cellulaires de 10^3 UFC.mL⁻¹. Plus récemment, l'utilisation d'une approche cinétique sur 20 heures en milieu de culture a été conduite sur des souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Van den Driessche et al. 2014). Les auteurs ont pu corréler le temps nécessaire pour obtenir le maximum de fluorescence et le temps nécessaire pour obtenir une fluorescence de 100 000 RFU aux densités cellulaires, sur une gamme de 10^3 à 10^8 UFC.mL⁻¹ pour *S. aureus* et de 10^2 à 10^7 UFC.mL⁻¹ pour *P. aeruginosa* (Figure 36). Cette approche cinétique a été reprise par (Dalecki et al. 2016) qui ont utilisé le délai de conversion exponentielle de la résazurine (temps pour atteindre le point d'inflexion du signal de fluorescence) pour évaluer l'effet de la gentamycine sur des biofilms de *S. aureus* (Figure 37). La prise en compte de la cinétique de réduction de la résazurine apparaît ainsi comme une amélioration importante de l'essai à la résazurine permettant d'augmenter la gamme de concentration cellulaire et d'analyser des biofilms avant et après traitement biocide.

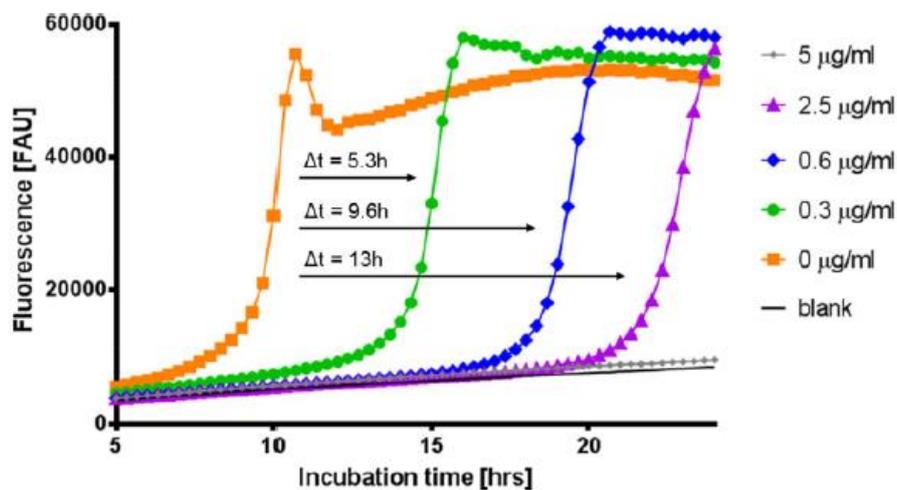


Figure 37 : Cinétiques d'apparition de la fluorescence pour des biofilms traités à différentes concentrations de gentamycine. Δt indique la différence entre le temps nécessaire pour atteindre le point d'inflexion du biofilm traité et celui du biofilm contrôle (Dalecki et al. 2016)

4 Souches modèles

Le choix de modèles bactériens est nécessaire pour évaluer au mieux *in vitro* l'effet biocide des traitements physiques d'éradication des biofilms. En effet, l'utilisation de modèles bactériens permet de contrôler un maximum de paramètres et d'avancer dans la compréhension des mécanismes de réponse du micro-organisme de façon simplifiée. Dans notre étude, le choix s'est porté sur deux espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif) et *Leuconostoc citreum* (Gram positif).

Les principales caractéristiques des espèces ainsi que des précisions sur les souches utilisées sont présentées ci-dessous.

4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1 Taxonomie et caractéristiques physiologiques

Le genre *Pseudomonas* fait partie du phylum des Protéobactéries et appartient à la classe des Gammaprotéobacteria et à la famille des *Pseudomonadaceae* (Yahr and Parsek 2006). Il s'agit de bacilles à Gram négatif, mobiles, aérobies stricts et oxydase positive. Ce genre comprend environ 250 espèces dont *P. aeruginosa*, qui est l'espèce type du genre et de ce fait la plus étudiée (<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>).

Les *P. aeruginosa* sont des bacilles de 0,5 à 0,8 µm de large et de 1,5 à 3 µm de long, mobiles grâce à un flagelle polaire (Jayaseelan et al. 2014). Ils sont chimio-organotrophes à métabolisme oxydatif (non fermentaire) mais peuvent en conditions limitantes en oxygène assurer une respiration nitrate. Ceci leur permet d'utiliser une grande variété de substrats organiques et inorganiques (Moore et al. 2006). Bactérie mésophile, elle se développe dans une large gamme de températures allant de 4 à 42°C, avec une croissance optimale à 37°C. *P. aeruginosa* cultive préférentiellement à un pH neutre, même si la croissance est possible pour des pH allant de 4,0 à 8,0 (Moore et al. 2006).

P. aeruginosa est également caractérisé par la production de pigments. La pyoverdine (un peptide non ribosomique), de couleur jaune à vert et fluorescent, synthétisée lorsque la bactérie se trouve dans un milieu carencé en fer. Il s'agit en effet d'un sidérophore qui complexe les ions ferriques et facilite leur transport à travers la membrane. Certaines souches produisent également de la pyocyanine, un pigment non fluorescent de couleur bleu-vert en milieu neutre ou alcalin, de la famille des phénazines. Ce composé joue le rôle de transporteur

d'électrons dans des conditions d'anaérobiose et possède une activité bactériostatique sur diverses bactéries, surtout à Gram positif (Jayaseelan et al. 2014). C'est également une molécule signalale du quorum sensing.

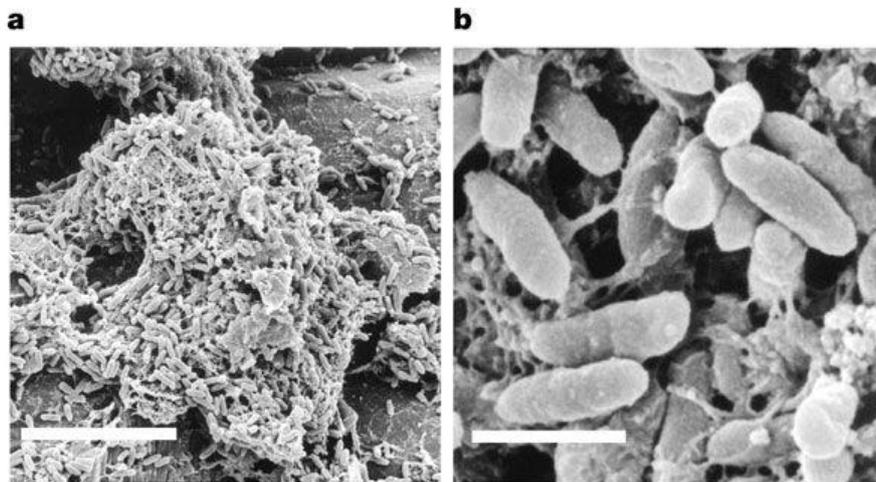


Figure 38 : Observation en microscopie à balayage d'un biofilm de *P. aeruginosa* formé à la surface d'un caillou, a) barre d'échelle, 10 µm. b) barre d'échelle, 1 µm (Whiteley et al. 2001)

L'ensemble de ces caractéristiques font que cette bactérie est connue pour sa capacité à former des biofilms dans de nombreuses conditions environnementales et *in vitro* dans la plupart des conditions de culture (O'Toole and Kolter 1998a; O'Toole and Kolter 1998b). *P. aeruginosa* est d'ailleurs une bactérie modèle pour l'étude des biofilms (Toyofuku et al. 2012) L'architecture et la composition de la matrice extracellulaire des biofilms dépendent des conditions environnementales et des caractéristiques intrinsèques des souches. Les ePS matriciels correspondent à l'alginate (pour les souches mucoïdes), le Pel, le Psl qui s'enroule hélicoïdalement à la surface des cellules (voir p.38). La matrice est également composée d'ADN extracellulaire et d'exoprotéines comprenant les fimbriae (Cup A, CupB et CupC), les lectines (LecA et LecB), la protéine CdrA et les fibres amyloïdes (FapC) (Lembre et al. 2012; Wei and Ma 2013; Taglialegna et al. 2016) (Figure 39). L'ADN extracellulaire est libéré dans le milieu extracellulaire par un phénomène actif ou un mécanisme d'autolyse régulé par le QS (voir p.40).

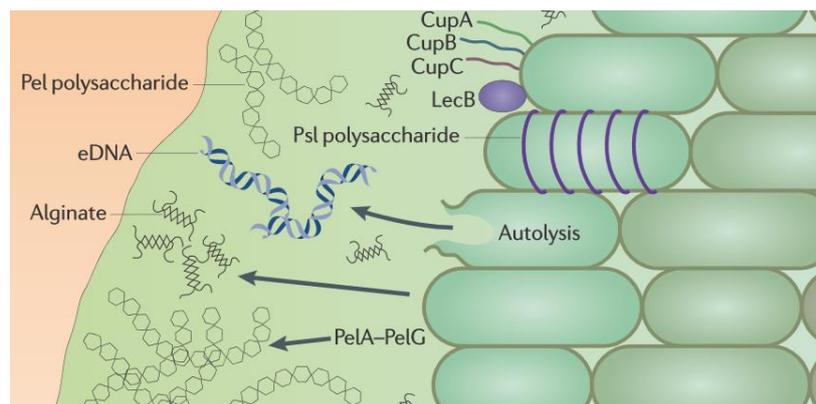


Figure 39 : Composition de la matrice de *P. aeruginosa* schématisé par (Hauser and Ozer 2011)

En 2000, le séquençage complet du génome de la souche PAO1 a mis en évidence une taille de 6,3 Mpb et 5 570 ORF (Open Reading Frame) et un %GC de 66,6% (Stover et al. 2000). Il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens. Sa taille et sa complexité sont très vraisemblablement à l'origine de la grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* à des environnements très variés. En effet, son génome contient un très grand nombre de gènes impliqués dans le catabolisme, le transport et l'efflux de composés organiques ainsi qu'une très forte proportion de gènes régulateurs (env. 10%).

La base de données « The *Pseudomonas* Genome DataBase » (www.pseudomonas.com) regroupe à ce jour 215 séquences complètes de génome et plus de 3000 séquences sous forme de génomes incomplets (au 18 novembre 2018).

4.1.2 Habitat et pouvoir pathogène

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire, largement répandue dans l'environnement. Elle se développe dans les sols, sur les végétaux (légumes, fruits et fleurs), dans les eaux douces et marines (eaux thermales, piscines) et peut même survivre dans les eaux minérales ou déminéralisées (Moore et al. 2006).

P. aeruginosa peut exister à l'état commensal, mais est surtout décrite comme un pathogène opportuniste capable d'infecter une grande variété d'hôtes: humains, animaux vertébrés et invertébrés et plantes (Yahr and Parsek 2006). Cette bactérie colonise particulièrement les personnes immunodéprimées, les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose. C'est d'ailleurs une des causes majeures de pneumopathies et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (Lee and Yoon 2017). Elle est par ailleurs

responsable de nombreuses infections intestinales ou urinaires, de dermatites et d'otites externes. Les souches de *P. aeruginosa* produisent différents facteurs de virulence : des adhésines (pili de type IV), des enzymes (protéases, élastases, phospholipases), des exotoxines et les pigments pyoverdine et pyocyanine (Yahr and Parsek 2006; Lee and Yoon 2017). Les phénotypes de *P. aeruginosa* associés aux infections chroniques sont caractérisés par un caractère mucoïde dû à la surproduction d'exopolysaccharides, et notamment d'alginate, qui favorise la formation de biofilms et la diminution de l'expression des facteurs de virulence (Yahr and Parsek 2006; Wei and Ma 2013).

L'espèce *P. aeruginosa* (avec *S. aureus*) est l'un des premiers agents responsables de maladies reliées à des infections nosocomiales. En effet, à elle seule, elle est impliquée dans environ 9% des infections acquises à l'hôpital en Europe (Khelissa et al. 2017).

Par ailleurs, la présence de ce micro-organisme dans l'industrie alimentaire est synonyme de détériorations (pour différents produits carnés, poissons et aliments réfrigérés) (Gram et al. 2002). Par exemple, la production d'enzymes lipolytiques et protéolytiques par *P. aeruginosa* entraîne une diminution des qualités technologiques et sensorielles du lait pasteurisé (Meliani and Bensoltane 2015).

P. aeruginosa est également caractérisée par une grande résistance aux antibiotiques et autres agents antimicrobiens, en relation avec une faible perméabilité de sa membrane interne et l'existence de mécanisme d'efflux très actifs (Hancock 1998; Lebeaux et al. 2014). En février 2017, l'organisation mondiale de la santé (OMS) l'a d'ailleurs classé dans le groupe des 3 agents pathogènes les plus critiques du point de vue de l'antibiorésistance avec *Acinetobacter baumannii* et les *Enterobacteriaceae*, et pour lesquels la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques est prioritaire.

Par ailleurs, Toyofuku et al. 2012 ont réalisé une approche protéomique pour étudier la synthèse des protéines par *P. aeruginosa* sous la forme de biofilms (Toyofuku et al. 2012). Différentes protéines de réponse au stress oxydatif sont retrouvées dans la fraction protéique du biofilm, avec notamment des catalases (dont KatA retrouvée dans les OMVs). De plus, les pompes à efflux MDR (Multi Drug Resistance) sont aussi connues pour protéger contre le stress oxydatif via l'élimination active des ROS (Lebeaux et al. 2014).

4.1.3 La souche *P. aeruginosa* ATCC 15442

La souche *P. aeruginosa* ATCC 15442 (=DSM 939) est une souche qui a été isolée d'eau d'abreuvoir. Elle est décrite par la norme européenne AFNOR NF EN 1040 (2006) comme la souche de référence pour la détermination de l'activité bactéricide de produits antiseptiques ou désinfectants chimiques.

En comparaison avec d'autres souches de *P. aeruginosa* (exemple PAO1), cette souche est non invasive et non cytotoxique et ne produit pas de pyocyanine. C'est également une souche non mucoïde, ne surproduisant donc pas d'alginate. Son génome a été séquencé récemment et est disponible sous forme de 200 contigs (> 100 pb) dans la banque de données GenBank (Wang et al. 2014b). La taille de son génome est d'environ 6,77 Mpb, avec 6 351 gènes putatifs (CDS). En tant que bactérie modèle pour l'évaluation de l'effet bactéricide d'antiseptiques et désinfectants, de nombreuses publications font état de sa grande et large résistance à différents composés. Par exemple, Bridier *et al.* 2011 ont réalisé une étude sur la résistance de cette souche à deux désinfectants, l'acide peracétique et le chlorure de benzalkonium (respectivement agent d'oxydation et composé d'ammonium quaternaire). La forme biofilm a montré une résistance accrue par rapport à la forme planctonique : une concentration de 15 à 20 fois supérieure est nécessaire pour obtenir des résultats comparables (Bridier et al. 2011). Une autre étude a évalué l'effet d'une irradiation UV avec une lampe à vapeur de mercure sur des biofilms de cette souche : une dose de 40 mJ.cm⁻² permet de diminuer de 99% la population initiale et entraîne une diminution de la production de pyoverdine dans le milieu (Saidi et al. 2011).

Peu d'études en revanche ont été réalisées sur la nature de la matrice des biofilms de cette souche. Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré des concentrations élevées en polysaccharides, ADN extracellulaire, en protéines et plus particulièrement en fibres amyloïdes dans la matrice extracellulaire de biofilms immergés (Figure 40) (Randrianjatovo-Gbalou 2016).

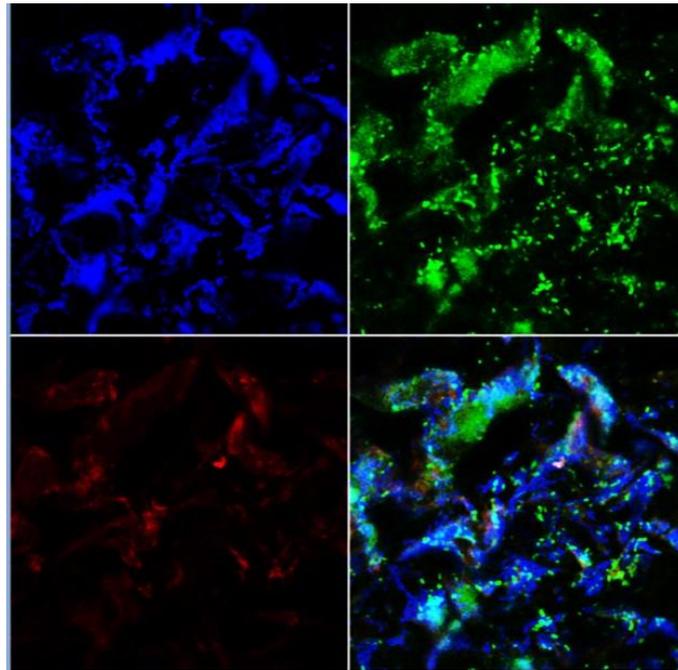


Figure 40 : Biofilm de *P. aeruginosa* observé en microscopie confocale à balayage laser : cellules marquées au DAPI (bleu), ePS marqués à la WGA-FITC (lectine de *Triticum vulgare*, vert), ePN marqués au SyproRUBY® (rouge) (Randrianjatovo-Gbalou 2016).

4.2 *Leuconostoc citreum*

4.2.1 Taxonomie et caractéristiques physiologiques

Le genre *Leuconostoc* fait partie des bactéries lactiques (LAB, *Lactic Acid Bacteria*) et appartient au phylum des Firmicutes et à la famille des *Leuconostocaceae*. Il est proche phylogénétiquement des genres *Weissella* et *Oenococcus* (Figure 41) (Björkroth and Holzapfel 2006). Ce sont des bactéries à Gram positif, non-mobiles, asporulées, anaérobies facultatives, ne possédant ni nitrate réductase ni catalase. Ce genre comprend 13 espèces dont *L. mesenteroides* qui en est l'espèce type (Björkroth and Holzapfel 2006). *L. citreum* est une espèce très proche phylogénétiquement de *L. mesenteroides* et de nombreuses souches n'ont pas été reclassifiées de façon officielle, d'où la dénomination *L. mesenteroides/citreum* par la suite.

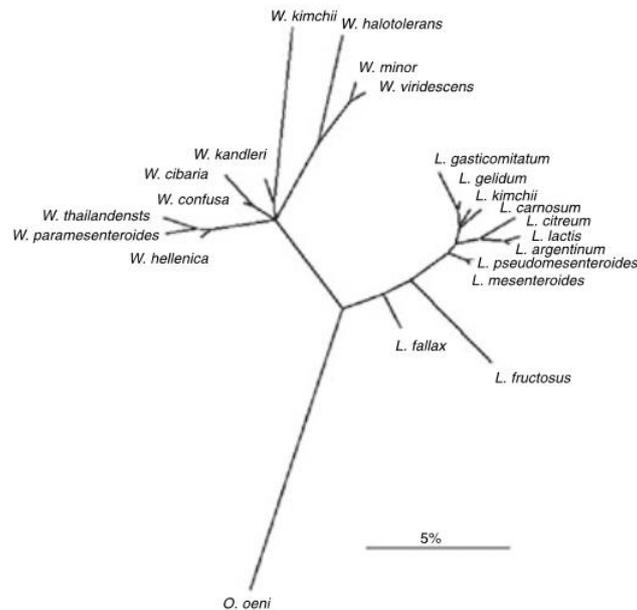


Figure 41 : Arbre phylogénétique obtenu sur la base d'alignement de séquences ARN 16S de *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* (Björkroth and Holzapfel 2006)

Les *L. mesenteroides/citreum* ont une forme lenticulaire, et sont organisés en paires ou en courtes chaînes (Figure 42). Ils ont des exigences nutritionnelles complexes et nécessitent l'apport de différents nutriments pour se développer : acides aminés, peptides, acides gras, oligoéléments et vitamines (Björkroth and Holzapfel 2006). Ces bactéries utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que des sucres, des alcools et des acides organiques. Elles sont hétérofermentaires strictes et produisent à partir des hexoses de l'acide lactique ainsi que de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone (Das and Manefield 2012).

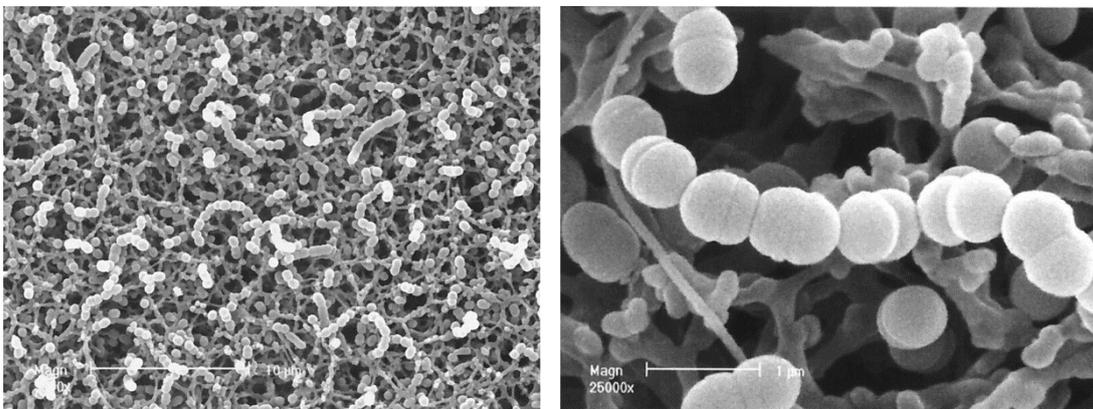


Figure 42 : Observation en microscopie à balayage de cellule de *L. mesenteroides* déposées sur membrane (Kaletunç et al. 2004)

Les souches de *L. mesenteroides/citreum* peuvent se développer à des températures de 5°C à 30°C, avec une température optimum de croissance se situant entre 20°C et 30°C (Björkroth and Holzapfel 2006). Ce sont des organismes acido-tolérants ; leur pH optimal de croissance est de l'ordre de 6,0 mais elles tolèrent des pH allant jusqu'à 3,2 (Björkroth and Holzapfel 2006). La plupart des souches de *L. mesenteroides/citreum* produisent des exopolysaccharides (glucanes et/ou fructanes) de très grande taille (10^5 à 10^9 Da) à partir du saccharose, et les niveaux de production peuvent atteindre quelques dizaines de g.L^{-1} (Ruas-madiedo et al. 2009), ceci se traduit par la formation de colonies muqueuses (Figure 43). Cette synthèse dépend de l'activité catalytique de transglycosidases extracellulaires qui utilisent le saccharose comme seul substrat et ne nécessitent donc pas de sucres activés comme dans le cas de la synthèse des hétéropolysaccharides (Figure 44).

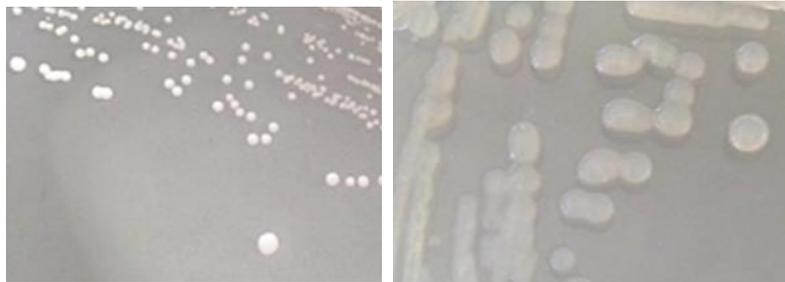


Figure 43 : Morphologie des colonies d'une souche de *L. citreum* sur milieu MRS avec et sans saccharose (40 g.L^{-1})

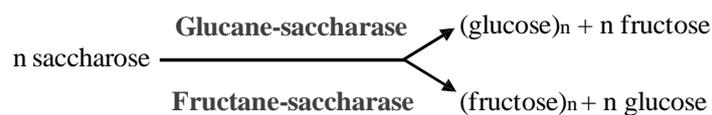


Figure 44 : Synthèse d'homopolysaccharide à partir de saccharose (Monsan et al. 2001)

La majorité des bactéries productrices ne dispose pas de l'équipement enzymatique nécessaire à leur dégradation ; le rôle de ces polymères le plus souvent proposé est de nature protectrice vis-à-vis de l'environnement (dessiccation, résistance aux agents antimicrobiens, aux stress acide ou oxydatif) (Yan et al. 2016).

Comme nous l'avons vu dans la partie 1, ces ePS peuvent également jouer un rôle important dans l'adhésion aux surfaces et la formation de biofilms, facilitant ainsi la colonisation de différents écosystèmes (Arena et al. 2017). Plusieurs *L. mesenteroides/citreum* produisant différents types de glucanes sont également capables de former des biofilms (Leathers and

Bischoff 2011). Le type de polymères (dextranes, alternanes) ne semble pas affecter la capacité de formation des biofilms qui dépend surtout de la souche.

On dispose à l'heure actuelle (18 novembre 2018) de 13 séquences de génome de *L. citreum* dont une seule séquence complète (souche KM20). La taille moyenne de son génome est de 1,83 Mpb, avec un %GC moyen de 38,9% et un nombre moyen de 1558 protéines (source Genbank). Les analyses ont montré une forte proportion de gènes codants pour des glycosidases et des transporteurs de sucres, en lien vraisemblablement avec leur relation privilégiée avec les végétaux (voir ci-dessous).

4.2.2 Habitat et utilisation

L. mesenteroides/citreum sont fréquemment isolées de végétaux et de produits végétaux fermentés mais aussi de la flore intestinale humaine et animale ou encore du lait maternel (Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004). Les *L. mesenteroides/citreum* sont des bactéries non pathogènes, avec un statut GRAS (pour Generally Recognized As Safe) et QPS (pour Qualified Presumption of Safety) (Arena et al. 2017). De très rares cas d'infections dues à ces bactéries ont été mis en évidence, essentiellement dans le cas de patients immunodéprimés. Ces micro-organismes, tout comme de nombreuses autres bactéries lactiques, ont un rôle-clé dans l'industrie agroalimentaire et sont employés dans la production de nombreux produits fermentés, par exemple, des produits végétaux fermentés (pain au levain, kimchi, choucroute) mais aussi des produits laitiers (beurre, fromages à pâte persillée) (Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004). Elles y dirigent la fermentation lactique qui conduit à une acidification du milieu ainsi qu'à la production d'arômes ou de précurseurs d'arômes. Ceci intervient de façon essentielle dans les qualités organoleptiques et la meilleure durée de conservation des produits fermentés (Naessens et al. 2005). De même, leur capacité de production de glucanes, en tant qu'hydrocolloïdes et agents texturants, a des applications dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, de la chimie fine et de l'industrie alimentaire (Naessens et al. 2005). Cependant, ces bactéries ont aussi été identifiées comme un agent de détérioration d'aliments (boissons, viandes, poissons) et peuvent être responsables de perte économique importante (Gram et al. 2002; Hemme and Foucaud-Scheunemann 2004; Björkroth and Holzapfel 2006). D'ailleurs, Pasteur dès 1861 avait établi que *L. mesenteroides* était responsable de l'augmentation de la viscosité observée dans les sirops de betteraves et de cannes à sucre lors des procédés d'extraction du saccharose.

4.2.3 *L. citreum* NRRL B-1299

La souche utilisée dans cette étude est la souche *L. citreum* NRRL B-1299 (= ATCC 11449). Initialement identifiée comme *L. mesenteroides* et non reclassifiée officiellement dans l'espèce *L. citreum*, on la rencontre donc encore parfois sous la dénomination de *L. mesenteroides* (Bounaix et al. 2010).

L. citreum NRRL B-1299 est connue pour être une des rares souches de *L. mesenteroides/citreum* capables de produire des dextrans ramifiés riches en liaisons α -(1,2) (Naessens et al. 2005; Monsan and Ouarné 2009). Cette souche produit en effet un dextrane ramifié qui, outre des liaisons α -(1,6) classiques, comporte jusqu'à 35% de liaisons α -(1,2). Ce type de liaisons, rares dans la nature, confère à ces composés une forte résistance aux enzymes digestives et stimulent la croissance de différentes bactéries intestinales (Naessens et al. 2005). Elle est ainsi exploitée commercialement pour la production d'oligosaccharides avec des propriétés prébiotiques (Monsan and Ouarné 2009).

Le séquençage récent de son génome a décrit une taille de 1,75 Mpb, un pourcentage en GC de 39,1%, et la prédiction de 1786 CDS (Passerini et al. 2014). L'analyse de cette séquence génomique a aussi permis de mettre en évidence la présence de 6 gènes codants pour des glucane-saccharases. Deux de ces enzymes sont impliquées dans la synthèse des liaisons α -(1,2) : DsrE, caractérisée dès 2002 (Bozonnet et al. 2002) et BsrA (Passerini et al. 2014). A noter que DsrE est la seule glucane-saccharase à posséder deux domaines catalytiques : CD1 responsable de la synthèse des liaisons α -(1,6) et CD2 responsable de la synthèse des liaisons α -(1,2) (Fabre et al. 2005).

Une seule étude a concerné la capacité de *L. citreum* NRRL B-1299 à former des biofilms (Badel et al. 2008). Ces auteurs ont ainsi mis en évidence l'influence du dextrane, mais aussi de l'ADN extracellulaire et des protéines (de façon indirecte en utilisant des hydrolases spécifiques) sur l'établissement d'un biofilm. Par ailleurs, Yan et al. ont décrit une nouvelle glucane-saccharase (Gsy) chez *L. mesenteroides* BD3749 qui intervient dans l'agrégation cellulaire et la protection à l'encontre d'un stress oxydatif (ROS) (Yan et al. 2016). Il a été décrit dans ces travaux que Gsy présente une identité de 50% avec le second domaine catalytique (CD2) de DsrE de *L. citreum* NRRL B-1299.

Objectifs de la thèse

Le mode de vie biofilm confère différents avantages aux bactéries qui le constituent. La matrice agit notamment comme une barrière protectrice rendant les cellules moins sensibles aux stress environnementaux. De plus, l'hétérogénéité phénotypique qui peut se manifester par l'apparition de cellules en état de dormance au sein du biofilm, peut exacerber sa résistance. Ce sont les raisons pour lesquelles les biofilms sont reconnus comme étant particulièrement résistants aux différents traitements chimiques employés pour les maîtriser, que ce soit dans le domaine médical (antibiotiques) ou industriel (détergents et produits oxydants).

Afin de diversifier les méthodes d'éradication des biofilms, de nouvelles techniques de traitement physiques sont en cours de développement. Ces travaux de thèse se sont ainsi focalisés sur un dispositif jet de plasma froid à la pression atmosphérique et un autre comportant une LED (diode électroluminescente) émettant dans les ultraviolets C.

Si les lampes à vapeur de mercure émettant des UV-C sont étudiées depuis longtemps pour leur effet germicide, seulement deux études ont actuellement été réalisées concernant ce dernier type de traitement sur des biofilms

Les plasmas froids sont quant à eux de plus en plus étudiés, et sont même employés depuis quelques années pour leur action antimicrobienne sur cellules planctoniques ; de plus, quelques récents travaux décrivent également cette méthode comme prometteuse pour des applications sur des biofilms. Cependant, une grande hétérogénéité de méthodes expérimentales est observée (systèmes plasmas, protocoles de traitements, systèmes biologiques), ce qui rend difficile la comparaison des résultats des différentes études. En particulier, le choix du mode de formation et de traitement du biofilm est orienté en fonction de la question de l'étude et/ou des méthodes choisies pour analyser le biofilm. Un réel effort de standardisation semble donc nécessaire pour valider l'efficacité anti-biofilm et pouvoir mieux comprendre l'effet de ces différents traitements.

En ce qui concerne la composante biologique, le besoin de standardisation porte d'une part sur le biofilm lui-même, c'est-à-dire son mode de formation ainsi que sa composition tant en termes de cellules et de matrice. L'utilisation de biofilms modèles formés en conditions contrôlées *in vitro* au laboratoire permet de maîtriser un certain nombre de paramètres liés au vivant. Le second axe d'harmonisation est relatif aux méthodes analytiques du biofilm. En effet, la matrice peut être étudiée de façon qualitative (par des approches de spectroscopie ou de microscopie à fluorescence) ou quantitative (méthodes analytiques *ex situ* pour la plupart). De même, dans la majorité des travaux d'évaluation d'activité biocide, la composante cellulaire est

analysée par dénombrement classique sur milieu de culture. Or, cette technique ne permet pas de détecter et/ou quantifier les cellules en état de dormance (VNBC, *persiste*) qui peuvent être retrouvées au sein du biofilm du fait d'une hétérogénéité phénotypique ou du fait du traitement biocide en lui-même. D'autres types d'approches peuvent pallier cette limitation, parmi lesquelles la méthode moléculaire de viabilité qPCR, basée sur l'intégrité membranaire des cellules, et la méthode métabolique à la résazurine basée sur l'activité métabolique cellulaire.

Ainsi, quatre objectifs principaux, soit d'ordre méthodologique soit d'ordre scientifique, ont été définis pour ce travail de thèse et font l'objet des chapitres suivants :

- La standardisation, en termes de densité cellulaire et de composition de la matrice, de biofilms bactériens mono-espèce modèles, et une caractérisation de ces biofilms ;
- L'évaluation de l'effet biocide d'un prototype de jet de plasma froid à la pression atmosphérique et l'étude de l'implication de la matrice (quantitativement et qualitativement) et des cellules (densité cellulaire, propriétés pariétales) dans la réponse ;
- L'évaluation de l'effet biocide d'un dispositif avec une LED UV-C, selon le même schéma ;
- Le développement d'une méthode de quantification de la viabilité cellulaire alternative ou complémentaire au dénombrement sur boîte.

Ce travail a été mené en utilisant deux souches bactériennes en parallèle : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 , espèce très largement utilisée pour les études dans le domaine des biofilms, et *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 appartenant aux bactéries lactiques, plus originales dans ce domaine d'étude. L'intérêt de ces deux souches est qu'elles présentent des caractéristiques pariétales différentes, respectivement à Gram négatif et à Gram positif, et surtout qu'elles permettent de cibler la formation de biofilms ayant une composition matricielle différente.

Partie 2-Résultats

Matériels et méthodes

1 Milieux et conditions de culture des souches bactériennes

La souche *L. citreum* NRRL B-1299 (= ATCC® 11449™) est cultivée classiquement en milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe) à 30°C. Lorsque cela est nécessaire, du saccharose à la concentration de 40 g.L⁻¹ est rajouté dans le milieu MRS de façon à induire l'expression des glucane-saccharases et à déclencher la production de glucanes extracellulaires.

Pour la souche *P. aeruginosa* ATCC®15442™, les cultures sont réalisées en milieu LB (Luria Bertani) et l'incubation est réalisée à 37°C. Le milieu LB a été choisi parmi différents milieux testés préalablement (MRS, TS : Trypticase soja, PCA : Plate Count Agar) car il évite la production de pyoverdine qui pourrait entraîner un biais lors des traitements ou des dosages. La composition des milieux de culture MRS et LB est donnée dans le Tableau 7 et les références des milieux et des réactifs utilisés dans cette étude sont précisées en Annexe 4. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Tableau 7 : Composition des milieux de culture utilisés

Milieux	Luria Bertani (LB)	de Man Rogosa Sharpe (MRS)
Composition	Tryptone : 10 g.L ⁻¹ Extrait de levure : 5 g.L ⁻¹ NaCl : 5 g.L ⁻¹ pH = 7,0 ±0,2	Polypeptone : 10 g.L ⁻¹ Extrait de viande : 10 g.L ⁻¹ Extrait autolytique de levure : 5 g.L ⁻¹ Glucose : 20 g.L ⁻¹ Tween 80 : 1,08 g.L ⁻¹ Phosphate dipotassique : 2 g.L ⁻¹ Acétate de sodium : 5 g.L ⁻¹ Citrate d'ammonium : 2 g.L ⁻¹ Sulfate de magnésium : 0,2 g.L ⁻¹ Sulfate de manganèse : 0,05 g.L ⁻¹ pH = 6,4± 0,2
	Agar 15 g.L ⁻¹	

Les souches sont conservées en cryotubes à -25°C et à -80°C dans 20% de glycérol (1,2 mL de suspension bactérienne issue d'une culture de nuit et 600 µL de glycérol à 60%).

A partir d'un cryotube stock, une suspension bactérienne est réalisée dans 5 mL de milieu MRS ou LB, respectivement pour *L. citreum* et *P. aeruginosa* par prélèvement avec une anse. Cette suspension est mise à incuber durant la nuit à 30°C ou 37°C selon la souche. Un isolement sur

milieu gélosé ainsi qu'une coloration de Gram sont systématiquement réalisés pour valider la pureté de la suspension bactérienne obtenue. Cette suspension mère est ensuite conservée à 4°C durant 4 semaines maximum. Par la suite, pour obtenir une culture fraîche, 100 µL de la suspension mère sont ajoutés à 5 mL de milieu adapté à la souche, puis cette suspension est mise à incuber pendant environ 18 h (culture de nuit).

La relation entre la densité optique (DO) à 600 nm (spectrophotomètre Genova) et la concentration bactérienne a été déterminée pour les deux souches dans le cas des cultures de nuit. Ainsi, pour *L. citreum*, 1 unité DO à 600 nm équivaut à environ 1.10^8 UFC.mL⁻¹ en milieu MRS. Dans le cas de *P. aeruginosa*, 1 unité de DO 600 nm équivaut à environ 3.10^7 UFC.mL⁻¹ en milieu LB.

2 Formation de biofilms calibrés sur membrane d'esters de cellulose

2.1 Préparation de la suspension bactérienne calibrée

À partir d'une culture de nuit (environ 18 h), 20 mL de suspension bactérienne calibrée à la densité cellulaire voulue sont réalisées en utilisant la relation DO₆₀₀-concentration (CFU.mL⁻¹). Systématiquement, une nouvelle mesure de la DO₆₀₀ est réalisée sur la suspension bactérienne ainsi obtenue. Cette calibration permettra de former des dépôts sur membrane de densité cellulaire contrôlée de façon à obtenir des biofilms de *L. citreum* et de *P. aeruginosa* de même densité cellulaire après une croissance de 24 h.

2.2 Inoculation par filtration des membranes d'esters de cellulose

Les suspensions calibrées sont ensuite filtrées à l'aide d'un système de filtration stérile (Nalgène®) contenant une membrane stérile PALL GN-6 Metricel® adaptée pour la filtration (diamètre des pores de 0,45 µm, diamètre de 47 mm soit une surface de 17,3 cm², épaisseur de 152 µm) (Figure 45). Cette membrane quadrillée hydrophile est composée d'un mélange d'esters de cellulose (nitrate de cellulose et acétate de cellulose).

2.3 Préparation des coupons de membranes

La membrane ainsi inoculée est ensuite récupérée délicatement puis découpée, au moyen d'un ciseau stérile, en 4 coupons de 1,5 cm² (4 carreaux de côté, Figure 45). La similitude en terme de charge microbienne entre ces coupons a été confirmée par dénombrement : l'écart-type relatif sur la densité cellulaire entre les 4 coupons était de 2,4%. Chaque coupon est ensuite déposé individuellement au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu de culture. Par la suite, ce type d'échantillon sera appelé « **cellules déposées sur membrane** » ou **SSB (surface spread bacteria)**.

Pour le développement des **biofilms**, une série de boîtes préparées comme précédemment sont mises à incuber pendant 24 h à la température adaptée à la souche.

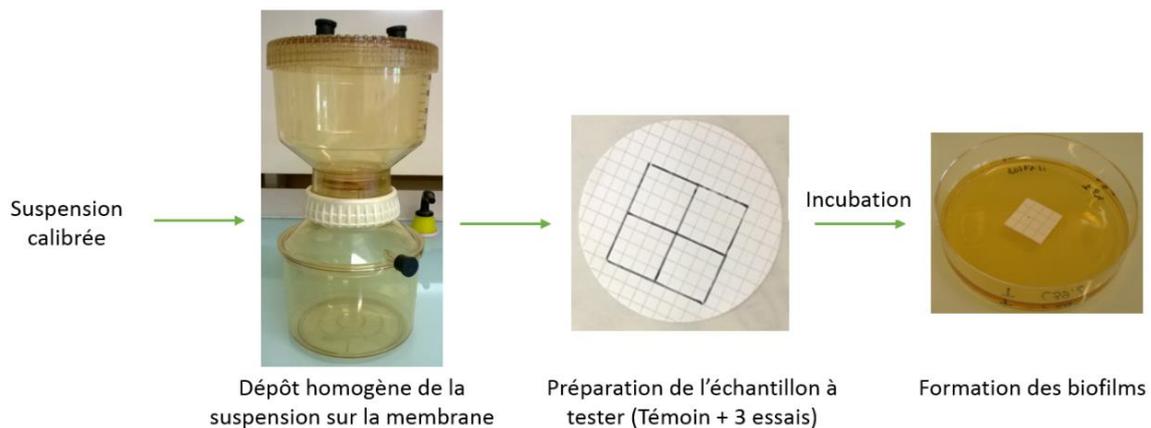


Figure 45 : Étapes de formation de biofilms sur membranes d'esters de celluloses

Par ailleurs, comme nous le mentionnerons plus loin (p. 136), lors d'une même expérimentation de traitement, un des coupons de la membrane initiale servira systématiquement de témoin non traité, ceci afin d'éviter au maximum toute variabilité de densité cellulaire entre les échantillons traités et le témoin.

3 Analyse des biofilms

3.1 Analyses *in situ*

3.1.1 Détermination de la masse sèche

Les biofilms formés sur les membranes d'esters de cellulose (membranes entières dans ce cas) sont déshydratés à l'aide d'un analyseur d'humidité (Sartorius MA30). Les échantillons humides sont pesés puis chauffés à 45°C jusqu'à l'atteinte d'une masse constante, constituant le poids sec. Le pourcentage d'humidité est ensuite calculé comme suit :

$$\% \text{ humidité} = \frac{\text{masse humide} - \text{masse sèche}}{\text{masse humide}} * 100$$

3.1.2 Spectroscopie infrarouge ATR-FTIR

La technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) fait partie de la spectroscopie vibrationnelle et permet d'obtenir des informations sur la structure et la composition chimique des échantillons étudiés (Nivens et al. 1995; Quilès et al. 2010; Humbert and Quilès 2011; Pan et al. 2016).

Principe

Cette technique permet de déterminer, de manière non destructive et en quelques minutes, la présence de groupements fonctionnels au sein de molécules. Un spectre est obtenu en irradiant l'échantillon dans le moyen infrarouge (entre 4 000 et 400 cm^{-1}) et en déterminant quelle fraction du rayonnement incident est absorbée à une énergie particulière. Toutes les radiations sont enregistrées de façon simultanée au moyen d'un interféromètre de Michelson. L'information est ensuite traduite en spectre à l'aide d'un algorithme mathématique (technique à transformée de Fourier) (Schmitt and Flemming 1994; Alvarez-Ordóñez et al. 2011).

L'analyse par le mode Réflexion Totale Atténuée (ATR) consiste à appliquer l'échantillon sur un prisme de cristal de fort indice de réfraction (n_c), soit en diamant ($n= 2,38$) soit en germanium ($n= 4,02$) (Figure 46). Le faisceau infrarouge pénètre dans le cristal ATR selon un angle typique θ de 45° (par rapport à la surface du cristal) et est totalement réfléchi au niveau de l'interface cristal-échantillon. L'onde incidente pénètre sur quelques micromètres (de l'ordre de 0,5 à

5 μm) dans l'échantillon dans lequel elle ne peut pas se propager, créant ainsi une onde dite évanescente. Ainsi, la réflexion totale est atténuée suivant les transitions vibrationnelles absorbées par l'échantillon. Après une ou plusieurs réflexions internes, le faisceau infrarouge quitte le cristal ATR et est dirigé vers le détecteur (Schmitt and Flemming 1994; Humbert and Quilès 2011).

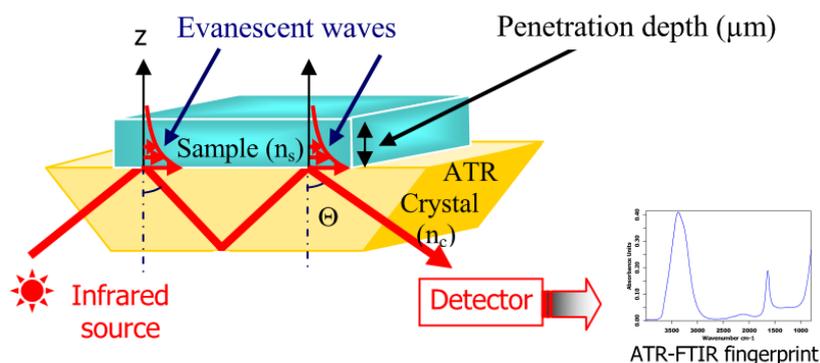


Figure 46 : Représentation schématique du FTIR-ATR, n_s correspond à l'indice de réfraction de l'échantillon, n_c l'indice de réfraction du cristal et θ l'angle d'incidence (Humbert and Quilès 2011)

Un spectre IR fournit ainsi une empreinte vibratoire spécifique de l'échantillon étudié, les différents pics correspondant aux bandes de vibration moléculaire des différentes molécules de l'échantillon (Humbert and Quilès 2011). Ainsi, pour un biofilm, les empreintes spectrales obtenues combinent les contributions des groupes fonctionnels présents dans toutes les molécules biochimiques de l'échantillon (composantes matricielles et cellulaires).

Deux modes de vibrations peuvent être observés (Figure 47), une vibration d'élongation (symétrique ou asymétrique) qui se caractérise par une modification de la longueur des liaisons des molécules et une vibration de déformation (cisaillement, balancement, rotation et torsion) pour laquelle une modification des angles est observée. Ainsi, les molécules subissent une grande variété de mouvements vibratoires, caractéristiques de leurs atomes constitutifs et de leurs liaisons chimiques.

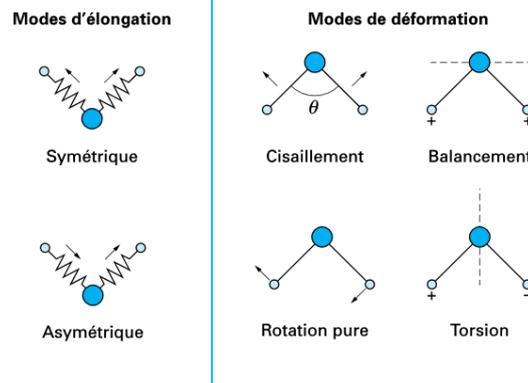


Figure 47 : Mode de vibration des molécules (illustré par une molécule CH₂) (Dalibart and Servant 2000)

L'empreinte spectrale de cellules bactériennes est principalement composée de la superposition de pics d'absorption de 5 biomolécules (protéines, lipides ou phospholipides, polysaccharides et acides nucléiques) et de l'eau, dans le cas d'échantillons hydratés (Figure 48).

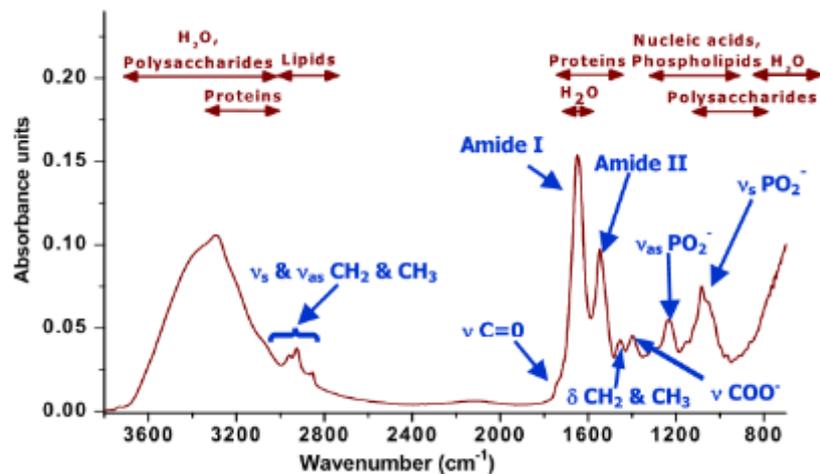


Figure 48 : Spectre ATR-FTIR d'un culot partiellement déshydraté de *Pseudomonas fluorescens* en fin de phase exponentielle de croissance (Humbert and Quilès 2011)

Afin d'aider à l'analyse des spectres infrarouges, des tableaux sont disponibles et permettent de faire correspondre les nombres d'ondes (en cm⁻¹) et des liaisons et leur mode de vibration (Tableau 8). Les pics d'un spectre peuvent ainsi être attribués aux principaux composés biologiques.

Tableau 8 : Correspondance des principales bandes de vibrations dans l'infrarouge de 3 000 à 900 cm^{-1} .
 1. Légendes : ν : élongation, δ : déformation, τ : torsion, a : asymétrique et s : symétrique (Quilès et al. 2010)

Wavenumber (cm^{-1})	Assignment	Principal compounds and/or functions	Main corresponding cellular compounds
2961	$\nu_s \text{CH}_3$	Fatty chains	Membranes
2925	$\nu_s \text{CH}_2$		
2897	νCH tertiary		
2874	$\nu_s \text{CH}_3$		
2854	$\nu_s \text{CH}_2$		
1736	$\nu \text{C=O}$	Esters from lipids	Membranes
1713	$\nu \text{C=O}$	Esters, carboxylic acids	Nucleoid, ribosomes
1700–1580	$\nu \text{C=O}$, $\nu \text{C=N}$, $\nu \text{C=C}$, δNH	ADN/ARN bases	Nucleoid, ribosomes
1693–1627	Amide I ($\nu \text{C=O}$ coupled with $\delta \text{N-H}$), $\delta \text{H}_2\text{O}$	Proteins, water (1640 cm^{-1})	Membranes, cytoplasm, flagella, pili, ribosomes
1568–1531	Amide II ($\delta \text{N-H}$ coupled with $\nu \text{C-N}$)	Proteins	Membranes, cytoplasm, flagella, pili, ribosomes
1468; 1455	δCH_2 , $\delta_s \text{CH}_3$	Lipids	Membranes
1400	$\nu_s \text{COO}^-$	Amino acids, fatty acid chains	Capsule, peptidoglycan
1317; 1281	τCH_2 , ρCH_2 , Amide III ($\nu \text{C-N}$ coupled with $\delta \text{N-H}$)	Fatty acid chains, proteins	Membranes, cytoplasm, flagella, pili, ribosomes
1238	$\nu_s \text{PO}_2^-$	Phosphodiester, phospholipids, LPS, nucleic acids, ribose	Membranes, nucleoid, ribosomes
1220	$\nu \text{C-O-C}$		
1200–900	$\nu \text{C-O}$, $\nu \text{C-C}$, $\delta \text{C-O-H}$, $\delta \text{C-O-C}$	Polysaccharides	Capsule, storage inclusions
1172; 1153	$\nu_s \text{C-OH}$, $\nu \text{C-O}$	Proteins, carbohydrates, esters	
1118	$\nu_s \text{CC}$	ARN, ADN	Nucleoid, ribosomes
1086	$\nu_s \text{PO}_2^-$	Phosphodiester, phospholipids, LPS, nucleic acids	Membranes, nucleoid, ribosomes
1058	$\nu_s \text{C-O-C}$, $\nu_s \text{P-O-C}$ (R-O-P-O-R')	Polysaccharides	Capsule, peptidoglycan
1041	$\nu \text{O-H}$ coupled with $\delta \text{C-O}$	Polysaccharides	Capsule, peptidoglycan
1026	CH_2OH	Carbohydrates	Storage inclusion
993		Ribose skelet (ARN)	Ribosomes
970	$\nu \text{C-C}$, $\nu \text{P-O-P}$	RNA backbone	Ribosomes

Acquisition des spectres infrarouge

Les spectres FTIR sont réalisés sur des échantillons préalablement déshydratés (voir p. 119) entre 4 000 et 800 cm^{-1} avec le spectromètre Spectrum 65 équipé du logiciel Spectrum software (Perkin Elmer). Pour chaque spectre, 32 accumulations ont été réalisées avec une résolution de 4 cm^{-1} . L'acquisition des spectres est réalisée au centre des coupons. En post-traitement, la ligne de base est corrigée pour chaque spectre. La fonction « comparer », permettant de comparer un spectre avec un autre ou avec un répertoire de spectres, est utilisée ici pour estimer la similarité entre les spectres deux à deux.

Les spectres sont ensuite normalisés à 1280 cm^{-1} , correspondant à un pic caractéristique de la membrane d'ester de cellulose de forte intensité, et pour lequel la réponse des échantillons biologiques est faible. Le pic amide II a été préféré au pic amide I (1650 cm^{-1}) pour estimer la fraction protéique en raison de l'absence de réponse de la membrane d'esters de cellulose à ce nombre d'onde (voir p. 146). Ce rapport, noté ensuite AmII/PS, permettra ainsi d'estimer la proportion relative entre polysaccharides et protéines au sein des échantillons, comme cela a été proposé par (Khan et al. 2016; Tareb et al. 2017).

Quatre types d'échantillons seront analysés après déshydratation :

- Les échantillons de biofilms de 24 h formés sur des membranes d'esters de cellulose ;

- Les cellules planctoniques des 2 souches issues de cultures de nuit (culot bactérien obtenu après centrifugation à 5000 g pendant 10 min « MiniSpin® Eppendorf ») ;
- Le polymère de dextrans purifié à partir d'une culture planctonique de *L. citreum* NRRL B-1299 réalisée en présence de saccharose, disponible au laboratoire sous forme lyophilisée (Bounaix et al. 2009) ;
- La membrane d'esters de cellulose.

3.1.3 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images tridimensionnelles de la surface d'un biofilm (Kishen and Haapasalo 2010). Elle permet une visualisation aussi bien des bactéries que de la matrice extracellulaire, ce qui permet d'étudier l'aspect et la structure du biofilm.

Les membranes comportant les biofilms sont placées dans un couvercle de boîte de Pétri pour être ensuite déshydratées à l'aide d'un dessiccateur sous vide pendant 15 min à 1 h selon les échantillons (le temps le plus long correspondant aux biofilms de *L. citreum* formés en présence de saccharose). Afin de limiter le plus possible l'altération de la structure de l'échantillon, aucune étape de fixation supplémentaire n'a été réalisée, comme proposé précédemment par (Lackmann et al. 2013). Le plus souvent en effet, les échantillons sont fixés par une solution de glutaraldéhyde puis séchés dans un gradient de solvants (éthanol, acétone). A l'issue de cette déshydratation, le solvant est éliminé par séchage au point critique (solvant substitué par du CO₂) ou par traitement à l'hexaméthylsilazane (Azeredo et al. 2017). Ce processus de traitements des échantillons peut endommager la structure du biofilm ou provoquer des artefacts.

La suite de la préparation, c'est-à-dire la métallisation (recouvrement des échantillons d'une couche de platine de 1 à 10 nm) qui va permettre l'acquisition des images, a été réalisée à la plateforme de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) de Toulouse (Métalliseur Leica EM MED020). Le microscope utilisé est un microscope à balayage électronique à effet de champ Quanta 250 FEG FEI.

3.1.4 Microscopie confocale à balayage laser

Principe

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) est une technologie couramment utilisée pour l'étude des biofilms et notamment de la matrice du biofilm (Lawrence et al. 1991). Cette méthode est non invasive et permet de visualiser les composés matriciels et/ou les cellules en 3D après utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques (Pan et al. 2016; Schlafer and Meyer 2017). Le principe de la CLSM est de pratiquer des coupes optiques virtuelles de très faible profondeur de champ. L'acquisition des images est réalisée sur différents plans à différentes profondeurs dans l'épaisseur du biofilm, et les images sont ensuite reconstituées pour obtenir une image en 3 dimensions (Pan et al. 2016; Wilson et al. 2017).

Marquage et observation des biofilms

L'observation en microscopie confocale à balayage laser étant délicate avec les membranes d'esters de cellulose du fait de leur auto-fluorescence, l'analyse en CLSM a été réalisée avec des biofilms formés sur un autre support : des membranes hydrophiles de polycarbonate noir Isopore™ GTBP 01300, commercialisées par Merck (diamètre 13 mm, pores de 0,2 µm représentant entre 5 et 20 % de la surface, et d'épaisseur 25 µm). Dans ce cas, les membranes sont déposées au centre de boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé adéquat pour la souche étudiée et inoculées par un dépôt en spot de 50 µL au centre de la membrane de suspension calibrée à 3.10^6 CFU.mL⁻¹ et 1.10^7 CFU.mL⁻¹ pour *P. aeruginosa* et *L. citreum* respectivement. Les boîtes sont ensuite incubées 24 h à la température adaptée afin de permettre le développement du biofilm.

Les biofilms obtenus sont ensuite transférés dans des puits de microplaque 24 puits pour procéder aux étapes de fixation et de marquage.

La fixation est réalisée par ajout de 500 µL de formaldéhyde à 3,7 % dans chaque puits suivi d'une incubation de 24 h (microplaques placées dans un système hermétique en atmosphère humide) selon la méthode décrite par (Randrianjatovo et al. 2015; Randrianjatovo-Gbalou et al. 2017). Après élimination du formaldéhyde, les biofilms sont rincés 3 fois avec 1 mL de PBS stérile (composé de tampon phosphate (0,01 M) et de chlorure de sodium (0,154 M)) avant de procéder à l'étape de marquage.

Trois marqueurs de spécificités différentes ont été utilisés :

- L'épicoconone (FluoroProfile Kit) permettant de marquer les protéines. Cette molécule pro-fluorescente ne fluoresce qu'en présence de sa cible, essentiellement un groupement amine primaire (-NH₂) retrouvé dans les protéines sur laquelle elle se fixe de façon covalente.
- Le TOTOTM-1 est un agent intercalant (dimère de cyanines) également pro-fluorescent qui présente une très grande affinité avec les acides nucléiques et se lie de façon stable avec l'ADN double brin, notamment du fait de ses 4 charges positives (Okshevsky and Meyer 2014).
- Le marquage PAS (Periodic Acid Schiff) permettant de marquer les polysaccharides. L'acide périodique permet dans un premier temps d'oxyder les groupements hydroxyles vicinaux des sucres, puis les groupements aldéhydes formés sont révélés par la fuchsine (réactif de Schiff). La méthode PAS a l'avantage de cibler une large gamme de sucres contrairement à l'utilisation de lectines conjuguées à un fluorochrome qui ont une spécificité étroite pour un résidu osidique donné (Amine Ben Mlouka et al. 2016).

Expérimentalement, les marquages ont été réalisés en plaçant les biofilms dans des microplaques 24 puits :

- Un premier biofilm sur lequel sera réalisé un co-marquage avec l'épicoconone et le TOTO-1[®]. Pour cela, le biofilm est mis en contact avec 40 µL de TOTOTM-1 à 2 µmol.L⁻¹ dans du DMSO pendant exactement 20 min ; l'échantillon est ensuite rincé 2 fois avec 50 µL de PBS stérile. Le biofilm est ensuite marqué par ajout de 40 µL de solution d'épicoconone (Fluoroprofile Protein Quantification kit), pendant 30 min, et finalement rincé 2 fois avec 50 µL de PBS stérile, selon la méthode décrite par (Randrianjatovo et al. 2015; Randrianjatovo-Gbalou et al. 2017).
- Un second biofilm, obtenu lors de la même série d'expérimentations, est mis en contact avec 40 µL d'acide périodique à 0,5 % (dilué dans de l'acide acétique à 5%) pendant 30 min. Les biofilms sont ensuite rincés 2 fois par 50 µL de PBS stérile puis mis en contact avec 40 µL de réactif de Schiff pendant 2 h et, finalement rincés 2 fois avec 50 µL de PBS stérile.

Les membranes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec 50 μL de Mowiol® 4-88. Des 'spacers' ou espaceurs adhésifs (spacer Secure-Seal™ de diamètre 13 mm et 0,12 mm d'épaisseur ; Invitrogen™) sont utilisés pour éviter la compression des échantillons par la lamelle. La polymérisation du Mowiol est réalisée pendant une nuit à température ambiante sur une surface plane. Les lames sont ensuite conservées à 4°C à l'obscurité jusqu'à observation.

Les différents échantillons ont été observés au moyen d'un microscope confocal Leica SP2 AOBS (Leica Microsystems, France) avec un objectif à immersion dans l'huile, 63x/0,9NA (acquisition réalisée à la plateforme d'imagerie FR AIB, Auzeville-Tolosane). L'épicoconone et le PAS ont été excités avec un laser hélium-néon à 561 nm et la fenêtre d'acquisition de la lumière émise était de 570 à 650 nm. Dans le cas du marquage avec le marqueur TOTO™-1, l'excitation a été réalisée avec un laser à argon à 488 nm avec une fenêtre d'acquisition de la lumière émise de 500 à 550 nm. L'acquisition des images avec le logiciel Leica LCS a été configurée pour prendre des numérisations d'images de 512x512 pixels (correspondant à 238 x 238 μm) à une vitesse de 400 Hz. L'analyse des images a ensuite été réalisée via le logiciel gratuit de Leica LAS X.

3.2 Analyses ex situ

3.2.1 Récupération des cellules bactériennes et dénombrement

Afin d'évaluer la population bactérienne, les cellules présentes sur chaque coupon (forme SSB ou biofilm) sont récupérées de manière « standardisée » de la façon suivante : le coupon est introduit dans un microtube avec 1 mL d'eau physiologique stérile (NaCl à 9 g.L^{-1}), les cellules sont décrochées par une série de 5 aspirations/refoulements en ciblant la surface de la membrane, puis le microtube contenant le coupon et la suspension est vortexé pendant 1 min pour s'assurer d'une récupération maximale.

Des dilutions décimales de cette suspension bactérienne sont ensuite réalisées en eau physiologique et 100 μL de chaque suspension sont étalées en surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu adéquat afin de réaliser des dénombrements après 24 heures d'incubation. Les colonies sont dénombrées (boîtes contenant entre 15 et 300 colonies) et les résultats sont exprimés en UFC.cm^{-2} ou en $\log_{10}(\text{UFC.cm}^{-2})$.

Le taux de récupération des cellules bactériennes déposées sur la membrane par la méthode décrite ci-dessus a été évalué. Pour cela, des échantillons ont été soumis à un deuxième traitement similaire : le coupon ayant subi la première phase de récupération est placé dans un nouveau microtube avec 1 mL d'eau physiologique stérile qui est vortexé à nouveau pendant 1 min, puis la suspension obtenue est dénombrée. Le pourcentage de récupération (nombre de cellules récupérées lors du premier cycle par rapport à la totalité des cellules décrochées) est de l'ordre de 90 % ($88,6 \pm 6,45$ dans le cas de cellules adhérentes de *L. citreum*, $n=5$, forme SSB). Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les spécifications de la membrane données par le fournisseur (taux de récupération > 90 % pour *Escherichia coli*) et les résultats obtenus dans les travaux de (Marchal et al. 2012). Une étape de sonication supplémentaire initialement envisagée pour la récupération des cellules n'a donc pas été jugée nécessaire, limitant ainsi le stress apporté aux cellules par cette étape de récupération.

3.2.2 Analyse *ex situ* de l'ADN extracellulaire

L'analyse de l'ADNe a été réalisée à partir de biofilms de 24 h de *L. citreum* et de *P. aeruginosa* formés sur membranes d'esters de cellulose (voir p. 117) puis récupérés en eau physiologique comme précédemment décrit dans le cas des numérations bactériennes (voir p. 126). Une simple étape de centrifugation (20 min à 4000 g) a été ajoutée de façon à obtenir un surnageant comportant les composés matriciels solubles les plus faiblement liés, fraction appelée 'surnageant Biofilm'. Des membranes non inoculées, mais incubées 24 h et traitées comme les biofilms, ont été utilisées en parallèle comme témoins pour vérifier l'absence d'interférences par des composés issus des milieux de culture.

L'analyse de l'ADN extracellulaire présent dans ces échantillons a ensuite été réalisée avec différentes méthodes détaillées ci-dessus.

Quantification de l'ADN extracellulaire par marquage au picogreen

La quantification de l'ADN contenu dans les surnageants est réalisée au moyen du marqueur fluorescent Picogreen® en utilisant le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay. Une gamme d'ADN de 1000 ng.mL^{-1} à 10 ng.mL^{-1} est réalisée à partir d'une solution commerciale d'ADN lambda à $0,5 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$. La solution de Picogreen® (200 X) est diluée en eau physiologique stérile à 1 X. Un volume de 50 μL d'échantillon ainsi qu'un volume de 50 μL de Picogreen 1 X sont ajoutés dans les puits d'une microplaque 96 puits. Après un temps de contact de 2 min,

l'intensité de fluorescence émise à 520 nm (excitation à 485 nm) a été mesurée avec le FLUOstar Optima (BMG Labtech).

Visualisation de l'ADNe par électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse classique en gel d'agarose est basée sur le principe que les acides nucléiques chargés négativement migrent vers l'anode lorsqu'un champ électrique est appliqué à ces derniers, la distance de migration est proportionnelle au poids moléculaire de la molécule. La visualisation des fragments est ensuite réalisée sous UV grâce à l'ajout dans le gel d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium (BET).

L'analyse des 'surnageants Biofilms' a ainsi été réalisée par dépôt de 10 µL d'échantillon additionné de 1 µL de tampon de charge 10 X (Glycérol 50 %, Bleu de bromophénol 0,25 %, Xylène cyanol 0,25 %, EDTA 0,2 M ; en TBE 0,5 X à pH 8), directement en gel d'agarose 1 % dans du tampon TBE 0,5 X (Tris-Borate-EDTA à 5 X : composé de Tris base (89 mM) et d'acide borique (89 mM), d'EDTA (2 mM) à pH 8,0). Après une migration de 20 min à 50 V puis 1 h à 100 V en TBE 0,5 X, les molécules d'ADN sont colorées par marquage au BET à 0,5 µg.mL⁻¹ et visualisées après exposition aux UV à 312 nm (E-Box VX5, Vilber). Le marqueur de taille utilisé est le SmartLadder (fragments de 200 à 10 000 pb), avec dépôt de 5 µL. Sauf indication contraire, l'ensemble des réactifs proviennent de Sigma-Aldrich.

Amplification PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) est une technique très sensible qui permet d'amplifier *in vitro* de façon exponentielle un fragment d'ADN spécifique. La technique repose sur l'hybridation, à chaque extrémité du gène ou de la région à amplifier, d'une paire de courtes séquences oligonucléotidiques synthétisées chimiquement, appelées amorces et la synthèse d'une nouvelle matrice d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH de ces amorces (étape d'élongation) par une ADN polymérase thermostable.

Pour amplifier spécifiquement l'ADN génomique de *P. aeruginosa*, le couple d'amorces Opr1/2 ciblant le gène *oprL* « peptidoglycan-associated outer membrane proteins » a été utilisé (Zhang et al. 2015). L'ADN de *L. citreum* est amplifié avec les amorces LcitF/R qui ciblent le gène de l'ADNr 16S (Lee et al. 2000).

Tableau 9 : Caractéristiques des amorces utilisées

Souche	Gène Cible	Nom	Sens	(5'--> 3')	Taille amplicon	Tm (°C)	GC%	Publication
<i>P. aeruginosa</i>	OprL	OPR-1	F	GACGTACACGCGAAAGACCT	98 pb	60,4	55%	(Zhang et al. 2015)
		OPR-2	R	GCCCAGAGCCATGTTGACT		60	55%	
<i>L. citreum</i>	16S RNA	Lcit-f	F	AAAACCTAGTATCGCATGATATC	1298 pb	52,6	30,4%	(Lee et al. 2000).
		Lcit-r	R	CTTAGACGACTCCCTCCCG		58,6	63,2%	

Les différentes amorces utilisées, fournies sous forme déshydratée, proviennent de chez Eurogentec ou Eurofins. Une remise en suspension est réalisée en eau de qualité biologie moléculaire (sans DNases et RNases) à une concentration stock de 100 µM, suspension conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Le mélange réactionnel (volume final de 25 µL) est constitué d'eau qualité PCR, de tampon PCR 1 X, de MgCl₂ à 1,5 mM, de dNTP à 200 µM, des amorces spécifiques (forward F et reverse R) à 0,5 µM chacune, de 0,025 U.µL⁻¹ (SilverStar DNA polymerase) et enfin de 2 µL d'ADN à amplifier.

Les amplifications sont réalisées avec le thermocycleur Gradient Master (Eppendorf).

Le programme d'amplification pour l'ADN de *P. aeruginosa* est celui défini par (Zhang et al. 2015) : une étape préalable de dénaturation de 5 min à 95°C, puis 35 cycles composés de 15 s à 95°C (étape de dénaturation), de 45 s à 60°C (étape d'hybridation) et de 1 min à 72°C (étape d'élongation), et enfin une dernière étape réalisée à 72°C pendant 5 min.

Pour l'amplification de l'ADN de *L. citreum*, le programme appliqué est le suivant : 5 min à 95°C, 15 s à 95°C (étape de dénaturation), 45 s à 58,4°C (étape d'hybridation), 1 min à 72°C (étape d'élongation) ; ces 3 étapes sont renouvelées 35 fois, puis une dernière étape est réalisée à 72°C pendant 5 min (Robert et al. 2009).

Dans chaque cas, un témoin négatif (sans ADN matrice) est réalisé ainsi qu'un témoin positif constitué d'ADN génomique extrait et purifié à partir de 0,5 mL d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance par extraction à l'aide du kit DNeasy® Blood and Tissue, selon les instructions du fournisseur.

Les produits d'amplification sont visualisés après migration en gel d'agarose à 1,5% dans du TBE 0,5 X pendant 30 min à 100 V. Dans chaque puits, 5 μ L de produit d'amplification sont déposés avec ajout de 1 μ L de tampon de charge 10 X. Le marqueur de taille utilisé est le SmartLadder SF avec un dépôt de 5 μ L (fragments de 1000 à 100 pb). Les amplicons sont ensuite visualisés par coloration au BET (10 min) et exposition sous UV.

4 Dispositif plasma

Le réacteur plasma utilisé a été développé par l'équipe PRHE (Plasmas Réactifs Hors Equilibre) du Laplace (Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie - UMR 5213) de Toulouse. Ce type de prototype, qui a fait l'objet d'un brevet (Merbaoui et al. 2011), est utilisé dans différentes études du Laplace portant sur des applications médicales, notamment le traitement de biomatériaux pour la régénération cellulaire (collagène, chitosane) (Yousfi et al. 2011; Samouillan et al. 2012). Il a également été utilisé précédemment dans le cadre d'une collaboration avec notre laboratoire pour des essais d'inactivation de biofilms de la bactérie lactique *Weissella confusa* (Marchal et al. 2012; Marchal et al. 2013).

Ce dispositif a l'avantage de produire **un jet de plasma auto-soufflé dans l'air ambiant** (sans apport d'autres gaz), généré par des décharges électriques haute tension. De plus, la température du jet de plasma est proche de la température ambiante et n'excède pas 27°C (Marchal et al. 2012).

Le dispositif de jet de plasma utilisé lors de cette étude (Figure 49-B et C) est composé d'une pointe en tungstène de 20 μ m de rayon à son extrémité constituant l'anode (+) (longueur de 50 mm ; diamètre de 1 mm à l'autre extrémité ; modèle X-2814-1 Ogura Jewel Industry) (Figure 49-A) et d'une cathode cylindrique (-) de 20 mm de diamètre intérieur en laiton reliée à la masse. Ce type de décharges électriques dans une configuration asymétrique pointe-cylindre est appelé décharge couronne ou corona. Le système est alimenté par un générateur à haute tension continue, à travers une résistance de 25 M Ω . La tension est réglée à 14,7 kV. Le générateur permet de créer des décharges électriques impulsionnelles d'une durée de quelques centaines de nanosecondes et avec une fréquence de répétition naturelle de quelques kHz (Figure 51), ceci permettant de limiter l'apparition d'un arc électrique.

Les échantillons sont exposés à une distance fixée à 2 cm de l'extrémité de la pointe. L'effluent de plasma visible dans l'air a un diamètre de 1 à 2 mm (Figure 49-B et C). Plus précisément, on

visualise une colonne principale voisine de 1 mm (là où le plasma est le plus émissif) centré sur l'axe de la pointe (là où se concentrent les lignes de champs) ainsi qu'une zone plus évasée au niveau de la surface à traiter qui forme une sorte de « parapluie inversé », traduisant l'évasement des lignes de champs à proximité de la cathode (Figure 49-B et C).

À noter que les travaux précédents du laboratoire sur l'inactivation de biofilms de la bactérie lactique *Weissella confusa* par jet de plasma ont été réalisés en utilisant un système dont certaines caractéristiques étaient différentes : pointe de 60 μm de rayon à son extrémité, tension de 20 kHz et une distance pointe-zone traitée de 1 cm (Marchal et al. 2012).

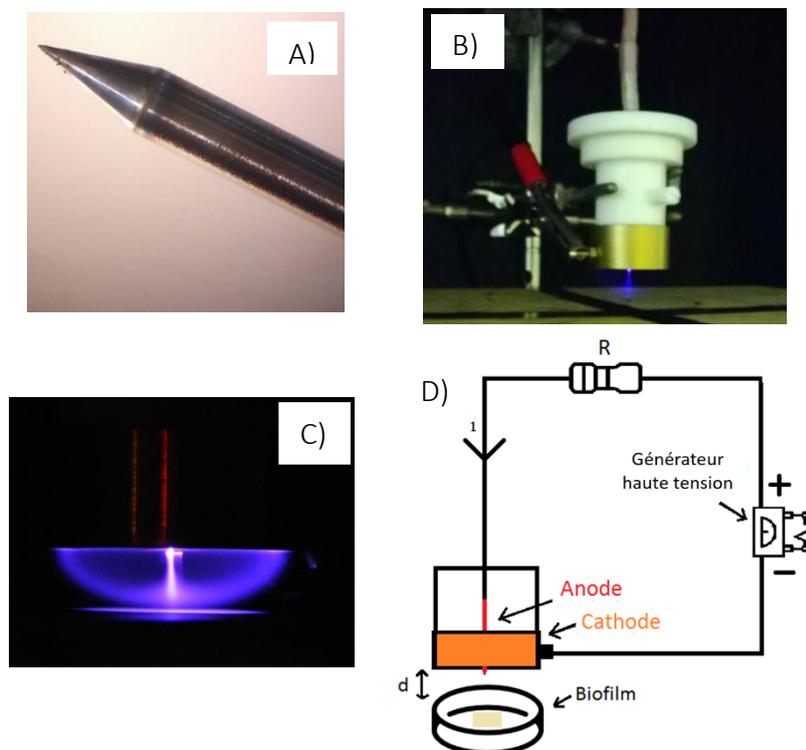


Figure 49 : Dispositif de jet de plasma froid utilisé. A) Pointe de 20 μm de rayon à l'extrémité (x 400). B) Le jet de plasma corona dans l'air ambiant. C) Visualisation du jet de plasma généré à l'obscurité. D) Schématisation du système. En rouge, pointe en tungstène. En orange, cathode cylindrique en cuivre. Abréviations : HT, alimentation haute tension. R, résistance. i, sens du courant électrique, d, distance pointe-échantillon.

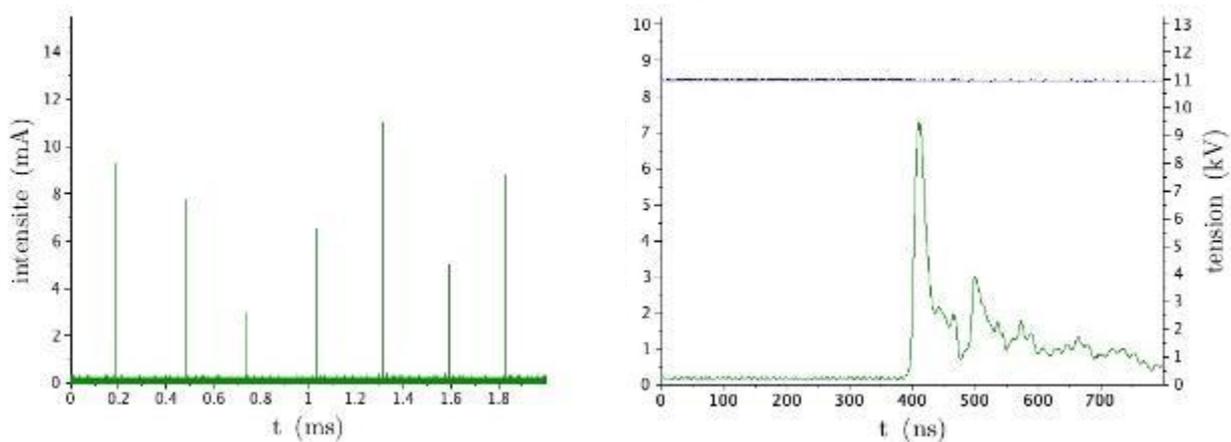


Figure 50 : A) Fréquence de répétition naturelle des impulsions de courant. B) Impulsions de courant enregistrées lors du traitement d'un biofilm de *L. citreum*. La puissance électrique dissipée est de l'ordre de 100 mW

La caractérisation des espèces réactives générées par le jet de plasma au contact d'un biofilm bactérien (*L. citreum*) a été réalisée par spectroscopie d'émission optique au laboratoire Laplace. L'acquisition des spectres a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de 0,75 m de focale (Acton Spectra SP 2750, dans la configuration Czerny Turner) et d'une caméra CCD Pixis-100 (Princeton Instruments 1340 x 100 pixels de 20 μm x de 20 μm) sensible à une gamme spectrale comprise entre 200 nm et 900 nm.

Les résultats ont révélé la présence d'espèces moléculaires excitées telles que l'azote N_2 , l'ion moléculaire d'azote N_2^+ (Figure 51-A) et les radicaux libres d'OH et d'O. En particulier, des émissions d'oxygène atomique ont pu être observées à 777 et 844 nm (Figure 51-B). Aucune émission n'a été détectée à une longueur d'onde inférieure à 280 nm, ce qui indique qu'aucun photon UV-C n'est produit dans l'effluent de plasma avec ce dispositif.

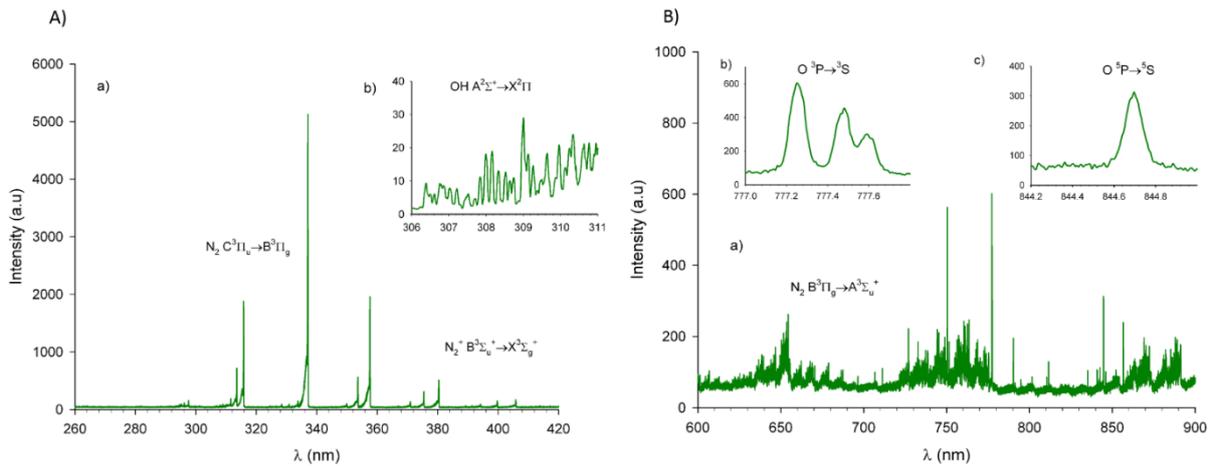


Figure 51 : Spectres d'émission du jet de plasma corona à l'interface d'un biofilm de 24 h de *L. citreum*, A) spectre d'émission dans les UV (260 à 440 nm) : a) Second système de l'azote positif N_2 (290 à 440 nm) et premier système de l'azote négatif N_2^+ (392 nm); b) Système OH (306 à 312 nm) ; B) Spectre d'émission dans le visible (600-900 nm) : a) Premier système positif de l'azote N_2 (650 nm et 750 nm) ; b) et c) Oxygène atomique O (777 nm et 844 nm)

Le même type d'espèces chimiques avait été mis en évidence dans le cas d'une mesure simplement dans l'air ambiant (Marchal et al. 2012). Seule l'émission de OH (dans la zone spectrale de 306 à 312 nm) est dans notre cas différente, vraisemblablement du fait de la teneur en eau importante du milieu MRS sur lequel la membrane est présente.

5 Dispositif LED UV-C

Les LED UV-C utilisées lors de cette étude sont des modèles OPTAN de Crystal IS utilisant la technologie nitrure de gallium (Figure 52-A). Crystal IS est l'un des principaux développeurs de LED UV-C et a débuté la commercialisation du modèle OPTAN, en 2014, disponible dans des longueurs d'onde de 250, 255, 260, 275 et 280 nm (Documentation OPTAN Life Science). Ces LED sont dotées d'une lentille sphérique en verre de silice fondue qui produit un demi-angle de rayonnement θ de 15° (Figure 52-B).

Deux LED UV-C différentes ont initialement été testées, une émettant à une longueur d'onde de 260 nm, maximum d'absorption des acides nucléiques, et de puissance 1 mW (modèle OPTAN-260J-BL), et l'autre émettant à 280 nm, maximum d'absorption des protéines et de puissance 2 mW (modèle OPTAN-280K-BL).

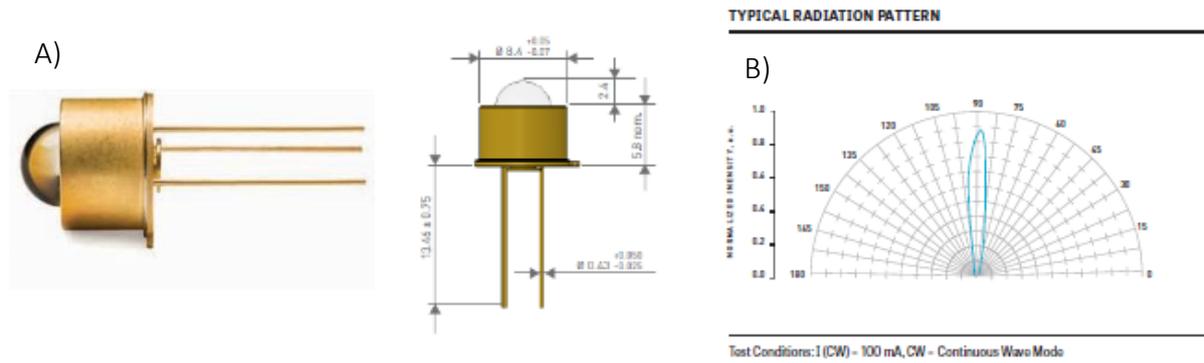


Figure 52 : Spécifications des LED UV-C Crystal IS modèle Optan

Pour une longueur d'onde donnée, ces LED se caractérisent par l'émission d'un spectre très étroit, contrairement aux lampes UV-C germicides classiques (Figure 53). Ainsi par exemple, pour la LED à 280 nm qui sera principalement utilisée lors de cette étude, le maximum d'émission est évalué expérimentalement à 281 nm et la largeur à mi-hauteur est de 13 nm seulement.

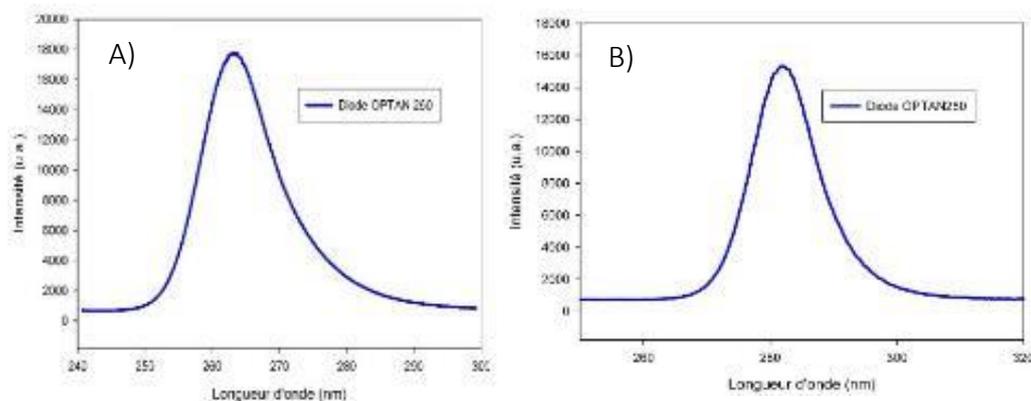


Figure 53 : Spectre d'absorbance des rayonnements UV, réalisé au Laplace : A) LED à 260 nm ; B) LED à 280 nm

Le dispositif complet a été élaboré par l'équipe PRHE du Laplace (Figure 54) et comprend en plus de la lampe LED UV-C montée sur un radiateur (Figure 54-B), un régulateur de courant alimenté par une tension continue et un générateur de tension. La tension électrique d'alimentation est de l'ordre de 10 V et le courant électrique est de l'ordre de 100 mA.

La puissance lumineuse délivrée varie légèrement en fonction de la température de la LED, par précaution, les traitements ont été réalisés après une phase de stabilisation de 5 min à température ambiante.

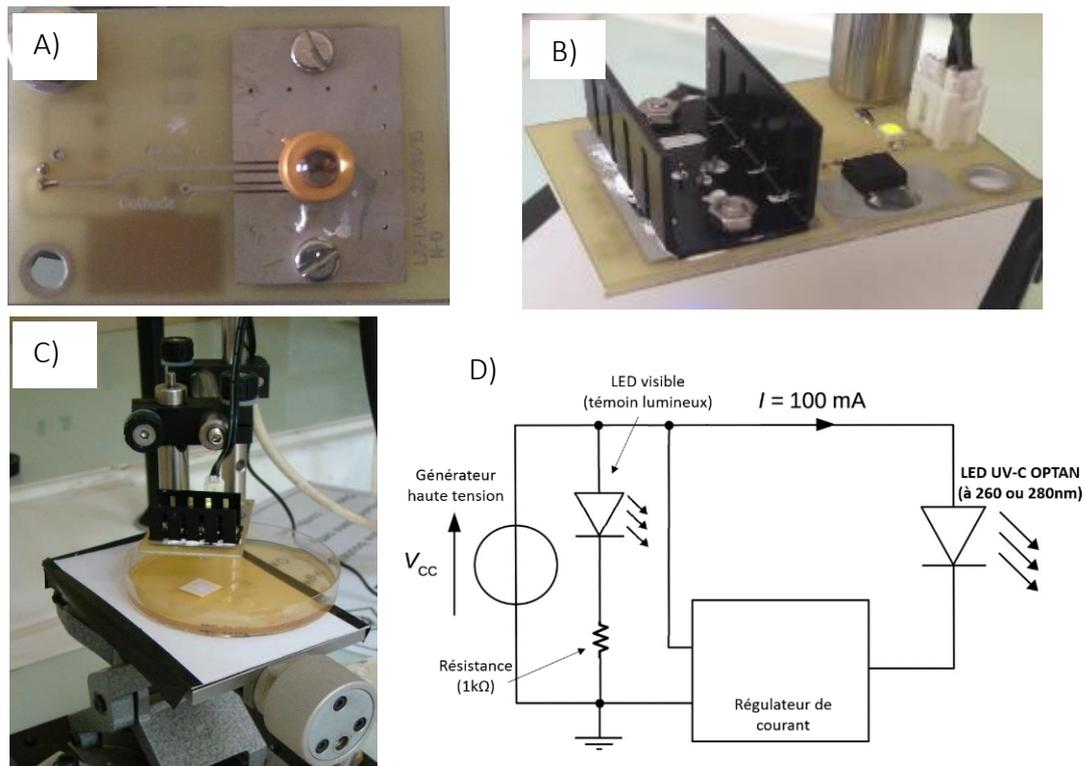


Figure 54 : Dispositif LED UV-C : A) Vue coté LED ; B) Vue de dessus montrant le radiateur de refroidissement de la LED (partie noire) ; C) Vue d'ensemble du dispositif lors d'un traitement ; D) Schématisation du circuit d'alimentation

Les échantillons sont irradiés à une distance fixe de 2 cm (Figure 54-C). L'irradiance I (puissance du rayonnement électromagnétique par unité de surface) de chaque LED est calculée comme suit :

$$I = \frac{P}{\pi d^2 \tan^2(\theta)}$$

Avec P : la puissance de la LED (1 ou 2 mW)

d : la distance entre l'échantillon et le LED (2 cm)

θ : l'angle de diffusion de la LED (15°)

Ainsi, l'irradiance est de $2,2 \text{ mW.cm}^{-2}$ pour la LED à 280 nm et de $1,1 \text{ mW.cm}^{-2}$ pour la LED à 260 nm. La dose reçue par l'échantillon est obtenue en multipliant l'irradiance de la LED par la durée d'exposition.

6 Évaluation de l'effet biocide des deux dispositifs

Comme indiqué précédemment dans la description de chacun des deux dispositifs, une distance fixée à 2 cm a été retenue entre l'échantillon et la source physique : extrémité de la pointe dans le cas du dispositif plasma, et surface de la lentille dans le cas du dispositif LED. Dans chaque cas, le traitement a été placé au centre de l'échantillon à tester et la durée de traitement peut varier de 5 à 20 min.

Inhibition de croissance d'une culture sur gélose

L'effet biocide peut être évalué par la détermination du diamètre d'inhibition de croissance de bactéries déposées en surface d'un milieu gélosé (Cao et al. 2011; Alkawareek et al. 2012b). Pour cela, 150 μ L d'une culture de nuit en milieu liquide sont étalés avec des billes de verre en surface d'un milieu gélosé. Les boîtes sont laissées environ 15 min à sécher sous PSM (poste de sécurité microbiologique) afin de s'assurer de l'absorption complète de la suspension. Les boîtes sont ensuite traitées avec le dispositif adéquat, puis mises à incuber pendant 24 heures. Pour chaque essai, un témoin négatif constitué d'une gélose inoculée de la même façon mais non exposé est réalisé. De plus, pour évaluer un effet potentiel du traitement sur les composants du milieu de culture, une gélose a été traitée pendant 10 minutes avant inoculation puis inoculée de la même façon que précédemment.

Dénombrement de la population bactérienne sur membrane après traitement

L'effet biocide des traitements sur les échantillons SSB ou Biofilms formés sur membrane est évalué par dénombrement bactérien classique.

Pour chaque expérimentation, les 4 coupons de 1,5 cm² issus d'une même membrane initiale ont été utilisés : un coupon correspondant au témoin non traité et un coupon par temps d'exposition, soit 5, 10 et 20 min (voir p.117).

Immédiatement après l'application du traitement, les cellules bactériennes sont récupérées à partir des membranes et dénombrées (voir p.126).

Les résultats des dénombrements permettent d'évaluer la diminution logarithmique de la population bactérienne, calculée par rapport au témoin interne de la membrane :

Réduction = \log_{10} (Concentration essai) - \log_{10} (Concentration témoin), avec la concentration en CFU.cm⁻².

7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels Prism5 (analyses de variance ANOVA et comparaison de moyennes) et XLStat (Analyse en Composantes Principales). Les comparaisons de moyennes ont été réalisées au moyen d'un test t de Student et les ANOVA ont été complétées par un test de Newman-Keuls ou de Dunnet, avec une probabilité de 5 %.

Chapitre I
Validation de la formation de biofilms
bactériens modèles calibrés et de l'effet
biocide des traitements

Ce chapitre I porte sur le développement méthodologique de la formation de biofilms bactériens modèles calibrés en vue de l'évaluation ultérieure de l'activité antimicrobienne des deux dispositifs étudiés, jet de plasma froid et LED UV-C, ainsi que sur la caractérisation par différentes approches des biofilms formés.

Une seconde partie sera consacrée à la validation de l'effet biocide des deux dispositifs de traitements dans les conditions définies. Cette validation n'a été réalisée qu'avec la souche de *L. citreum*, avant d'entreprendre une étude plus complète sur l'efficacité des traitements sur les deux souches et sur l'implication de la matrice extracellulaire dans la réponse des biofilms aux traitements appliqués (Chapitres II et III).

La formation de biofilms-modèles *in vitro* peut être réalisée sur différents types de supports. Les microplaques sont le dispositif le plus couramment utilisé dans le cadre de l'évaluation d'effets anti-biofilm, car elle présente l'avantage de pouvoir permettre des analyses à haut débit. Cette méthode comporte cependant certaines limites et peut manquer de reproductibilité : elle est sensible à la sédimentation, il peut y avoir une perte potentielle d'une portion du biofilm faiblement adhéree, et il peut être difficile de récupérer l'ensemble des cellules des biofilms formés dans les puits (Azeredo et al. 2017). Pour pallier à cette difficulté, des coupons, le plus souvent des lamelles de verre ou des coupons d'acier, peuvent être déposés à l'intérieur des puits de microplaques, permettant ainsi de récupérer et traiter plus facilement les biofilms (McBain 2009).

Par ailleurs, des biofilms aériens peuvent être réalisés par dépôt d'une culture bactérienne sur des membranes poreuses placées à la surface d'un milieu de culture gélosé en boîte de Pétri (Bayliss et al. 2012; Marchal et al. 2012). Cette méthode permet de déplacer le biofilm en limitant les contraintes physiques (telles que les forces de cisaillement) en vue de son analyse.

Dans le cadre de notre étude, la méthodologie de formation des biofilms doit remplir certains critères et permettre de :

- (1) former un biofilm avec chacune des deux souches retenues sur un même type de support, et que ces biofilms soient homogènes ;
- (2) maîtriser facilement la charge cellulaire par unité de surface ;
- (3) récupérer facilement les cellules du biofilm afin d'évaluer le niveau de population bactérienne, avec un taux de récupération maximal et sans effet sur l'intégrité cellulaire ;

- (4) être compatible avec à la fois un traitement par le dispositif jet de plasma et par le dispositif LED UV-C ;
- (5) si possible, l'utilisation de marqueurs fluorescents en vue d'une analyse des composantes matricielle et/ou cellulaire par microscopie confocale à balayage laser.

Ainsi, le choix s'est porté sur la formation de biofilms aériens sur membranes perméables d'esters de cellulose qui sont ensuite déposées à la surface d'un milieu de culture gélosé en boîte de Pétri, les éléments nutritifs et l'eau contenus dans le milieu assurant la croissance bactérienne. En effet, pour utiliser le jet de plasma les échantillons ne doivent pas être trop « enclavés » afin de permettre une bonne circulation de l'air, car sinon le jet de plasma « s'étouffe ». Ceci exclut donc l'utilisation de biofilms formés en microplaques (Annexe 5). De plus, la souche de *L. citreum* adhère peu aux supports, notamment sur le verre comme nous avons pu le montrer expérimentalement, et comme cela a, d'ailleurs, été décrit de manière générale pour les bactéries lactiques (Piard and Briandet 2015). Enfin, le taux de récupération des cellules sur membrane d'esters de cellulose est supérieur à 90 % (voir p. 127).

1 Validation de la formation de biofilms calibrés

Dans un premier temps, différentes densités bactériennes d'inoculation de *L. citreum* sur membrane d'ester de cellulose ($2 \cdot 10^3$ UFC.cm⁻², $2 \cdot 10^4$ UFC.cm⁻² et $3 \cdot 10^6$ UFC.cm⁻²) ont été testées pour obtenir un biofilm homogène, recouvrant l'ensemble de la membrane et permettant l'obtention de 4 coupons de densité cellulaire comparable. Les membranes inoculées ont ensuite été incubées sur milieu MRS pendant 24 h à 30°C. Les deux plus faibles densités cellulaires initiales n'ont pas permis de former un biofilm uniforme : visuellement, des colonies isolées sont nettement observées sur la membrane après 24 h d'incubation (Figure 55-A et B). En revanche, pour une inoculation avec une densité cellulaire initiale de $3 \cdot 10^6$ UFC.cm⁻² (soit un dépôt par filtration de 20 mL de suspension de *L. citreum* calibrée à une DO à 600 nm de 0,025), un biofilm couvrant l'ensemble de la membrane est bien obtenu (Figure 55-C). Dans ce cas, la densité cellulaire finale du biofilm de *L. citreum* est de $8,36 \pm 0,45 \log_{10}$ UFC.cm⁻² (n=8).

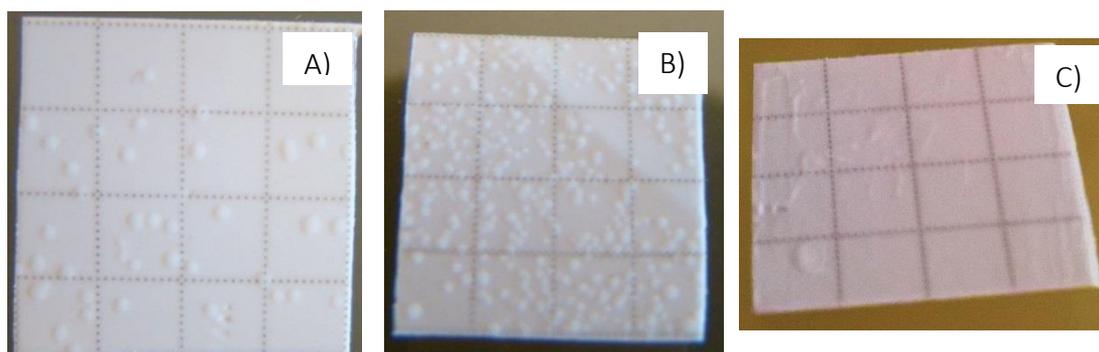


Figure 55 : Visualisation de la croissance de *L. citreum* après 24 d'incubation et un dépôt initial à différentes densités cellulaires ; A) Dépôt à une densité de 2.10^3 UFC.cm⁻², B) Dépôt à une densité de 2.10^4 UFC.cm⁻², C) Dépôt à une densité de 3.10^6 UFC.cm⁻²

Une même densité cellulaire d'environ 10^8 UFC.cm⁻² après 24 d'incubation a donc été retenue également pour la formation des deux autres types de biofilms : *P. aeruginosa* et *L. citreum* avec une matrice riche en glucanes (milieu MRS +saccharose).

Le même type de mode opératoire (dépôt par filtration de 20 mL de suspension de *L. citreum* calibrée à une DO à 600 nm de 0,025) permet d'obtenir de façon reproductible des biofilms de *L. citreum* formés sur milieu MRS supplémenté en saccharose avec une densité non significativement différente ($p < 0,05$) par rapport au biofilm développé sur MRS : $8,87 \pm 0,26 \log_{10}$ UFC.cm⁻² (n=8). Dans ce cas, la production de glucanes extracellulaires est clairement visible (Figure 56), donnant au biofilm un aspect très muqueux et couvrant une surface plus importante que celle du coupon.

En revanche, pour atteindre une densité cellulaire équivalente dans le cas des biofilms de *P. aeruginosa*, le dépôt initial doit avoir une concentration 10 fois plus faible, soit de 4.10^5 UFC.cm⁻² sur le coupon de membrane (correspondant à 20 mL de suspension à 0,01 de DO à 600 nm). La densité cellulaire obtenue pour le biofilm est alors de $8,12 \pm 0,41 \log_{10}$ UFC.cm⁻² (n=9) après 24 h d'incubation ; cette densité n'est pas significativement différente de celle des biofilms de *L. citreum* formés sur milieu MRS ($p < 0,05$). Le biofilm de *P. aeruginosa* comporte un aspect rugueux sur l'ensemble du coupon.

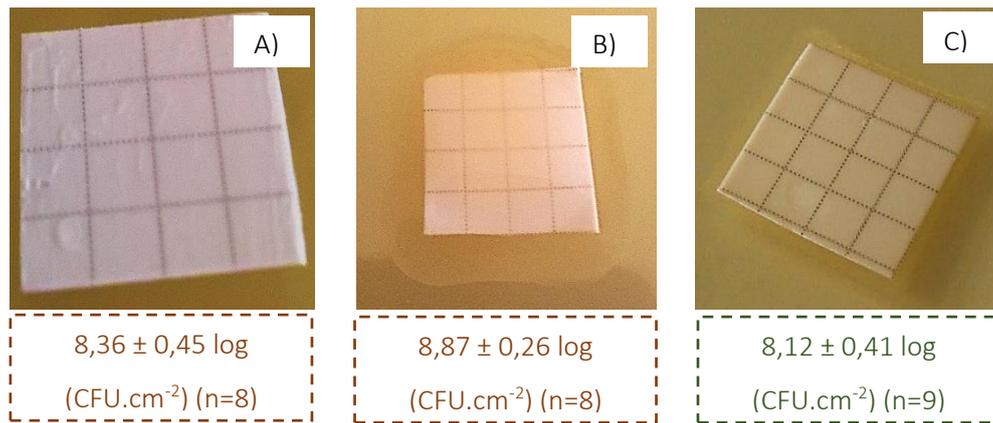


Figure 56 : Formation de biofilms calibrés ; A) Biofilm de 24 h de *L. citreum* formé sur milieu MRS, B) Biofilm de 24 h de *L. citreum* formé sur milieu MRS supplémenté en saccharose, C) Biofilm de 24 h de *P. aeruginosa* formé sur milieu LB

La Figure 57 résume les étapes clés de la méthode de formation des biofilms modèles de 24 h. La méthodologie développée répond aux objectifs et permet ainsi d'obtenir, de façon reproductible, des biofilms visuellement homogènes et de densité cellulaire contrôlée et ciblée à un niveau équivalent d'environ 10^8 UFC.cm⁻².

La méthode retenue permet également que les biofilms ne subissent aucune manipulation avant l'étape de traitement physique, contrairement à la majorité des études équivalentes sur l'effet biocide de systèmes plasma froid dans lesquelles les biofilms doivent être, la plupart du temps, déplacés et/ou déshydratés au préalable (Pei et al. 2012; Ziuzina et al. 2015; Mai-Prochnow et al. 2016).

En parallèle des biofilms de 24 heures, nous pouvons disposer également d'échantillons de cellules déposées sur membrane (SSB, *Surface Spread Bacteria*) à une densité cellulaire contrôlée.

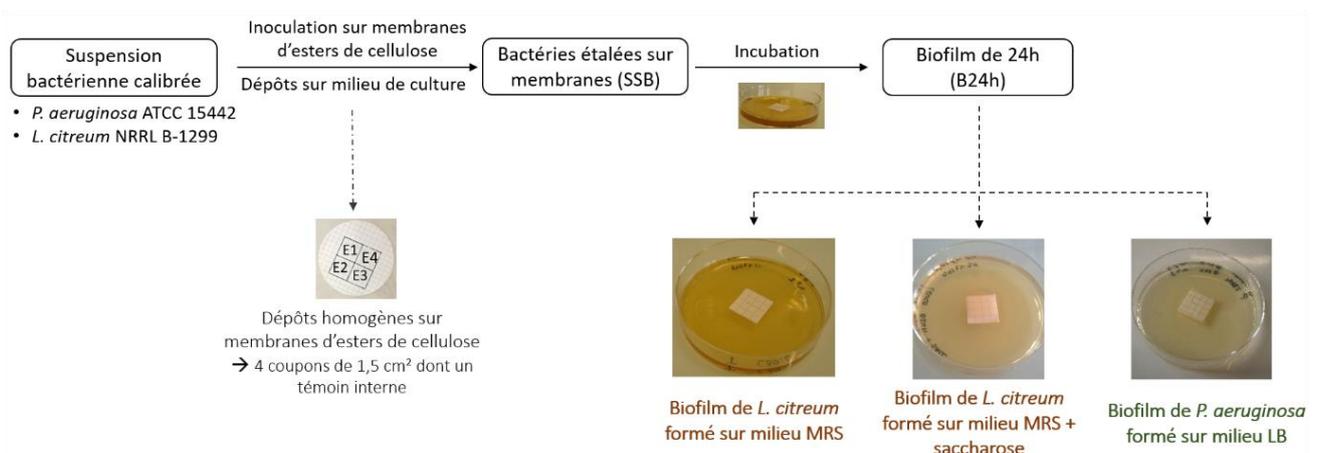


Figure 57 : Modalités de la formation des biofilms sur membrane d'esters de cellulose

2 Caractérisation des biofilms

Différentes analyses ont été réalisées sur les biofilms modèles de 24 h ainsi formés afin d'obtenir notamment des informations sur leur composante matricielle.

2.1 Biomasse totale

2.1.1 Masse sèche et humidité

L'évaluation de la masse sèche des biofilms de 24 h à densité cellulaire similaire a permis d'approcher quantitativement la différence en composés matriciels, déjà perceptible visuellement entre les trois types de biofilms. Ainsi, la masse sèche du biofilm de *L. citreum* en présence de saccharose est quatre fois supérieure à celle du biofilm de *L. citreum* formé sur milieu MRS (Tableau 10). Ces résultats permettent de rendre compte de la très forte production de glucanes extracellulaires par la souche en présence de saccharose. En ce qui concerne le biofilm de *P. aeruginosa*, la masse sèche évaluée est presque deux fois supérieure à celle du biofilm de *L. citreum*.

De plus, l'hydratation des trois biofilms est très élevée, avec une humidité toujours supérieure à 80 % ; le biofilm de *L. citreum* formé en présence de saccharose étant le moins hydraté (Tableau 10).

Tableau 10 : Evaluation de la biomasse et du taux d'hydratation des biofilms de 24-h

	<i>P. aeruginosa</i> (n=3)	<i>L. citreum</i>	
		Sans saccharose (n=2)	Avec saccharose (n=2)
Masse humide, mg	314 ± 21	255 ± 8	466 ± 23
Masse sèche, mg	35,8 ± 5,9	20,3 ± 2,5	82,0 ± 9,9
Humidité, %	88,5 ± 5,5	92,1 ± 0,7	82,3 ± 3,0

2.1.2 Microscopie électronique à balayage

Une analyse par microscopie électronique à balayage a permis de confirmer l'homogénéité des biofilms et le bon recouvrement des coupons ainsi que d'observer la morphologie de la surface des biofilms (Figure 58).

Quel que soit le biofilm, la structure microporeuse de la membrane d'esters de cellulose (Figure 58-A) n'est plus visible, indiquant le recouvrement de la totalité de la surface des membranes par le biofilm. La répartition homogène des cellules sur le support confirme également l'intérêt de la méthode d'inoculation des membranes par filtration. Ceci est en accord avec les travaux de Bayliss *et al.*, qui ont montré qu'un dépôt par filtration d'une suspension bactérienne permet d'obtenir une répartition plus homogène des micro-organismes sur une membrane par rapport à un dépôt plus classique en gouttes/spots qui peut conduire au développement d'agrégats (clusters) de cellules sur la membrane (Bayliss et al. 2012).

Les biofilms sont cependant morphologiquement différents : une ou plusieurs couche(s) dense de cellules distinctes et lisses est observée pour le biofilm de *L. citreum* cultivé sur milieu MRS, sans mise en évidence apparente de matrice extracellulaire. Dans le cas de milieu MRS additionné de saccharose, les cellules de *L. citreum* sont en revanche enchâssées dans une matrice épaisse et visqueuse en raison de la production de glucanes extracellulaires. En ce qui concerne le biofilm de *P. aeruginosa*, la surface est granuleuse et les cellules semblent liées entre elles par une matrice extracellulaire.

Ces observations sont cohérentes avec les valeurs de biomasse présentées dans la partie précédente, indiquant une matrice très développée pour les biofilms de *L. citreum* sur milieu MRS + saccharose, une matrice plus réduite pour les biofilms de *P. aeruginosa* et très peu de composés matriciels pour les biofilms de *L. citreum* formés sur milieu MRS.

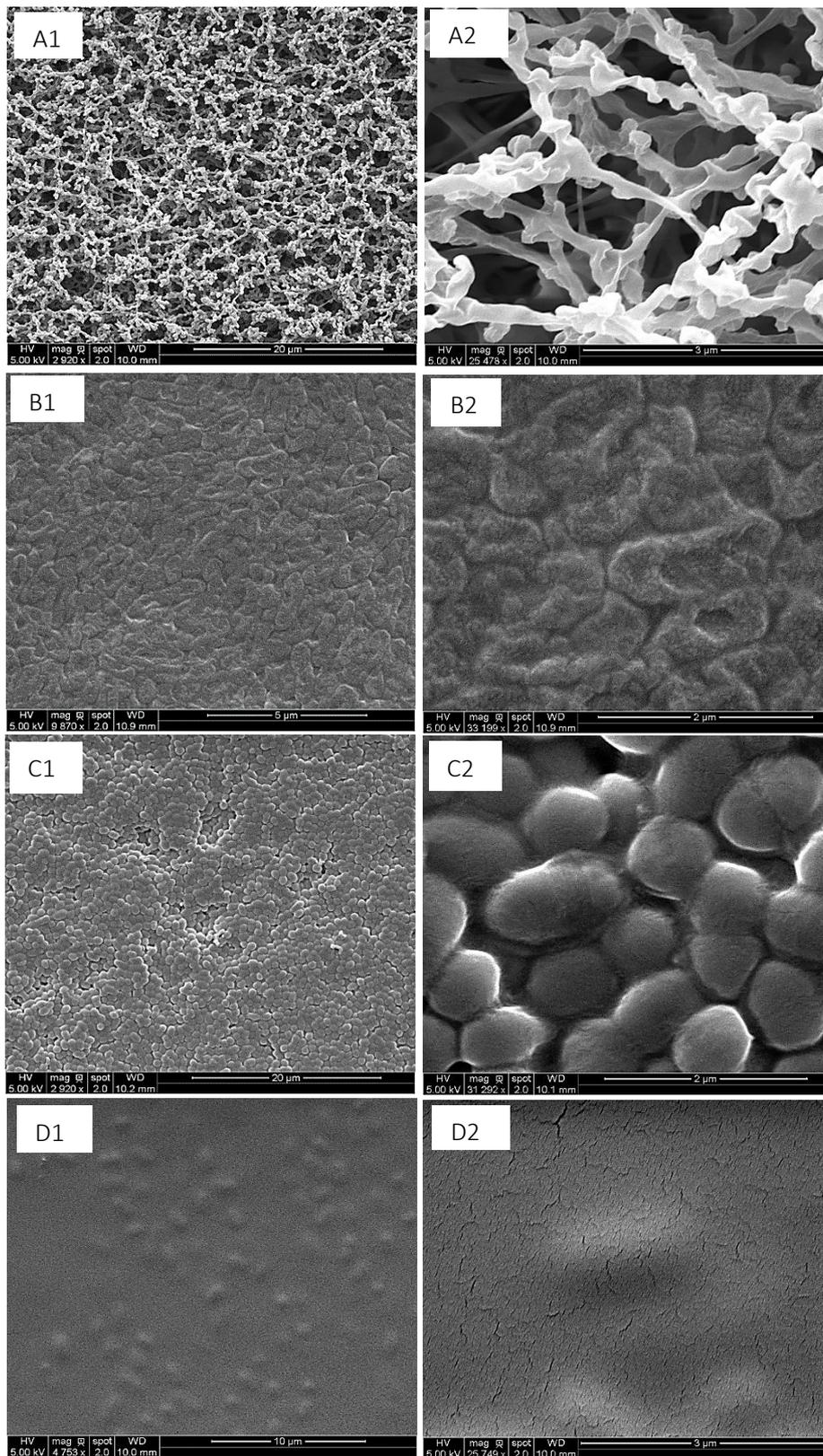


Figure 58 : Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) de la répartition des cellules des biofilms de 24 h, A) Membrane stérile d'esters de cellulose, A1) vue globale (x 2920), A2) vue agrandie (x 25478) ; B) *P. aeruginosa* en milieu LB, B1) vue globale (x 9870), B2) vue agrandie (x 33199) ; C) *L. citreum* en milieu MRS, C1) vue globale (x 2920), C2) vue agrandie (x 31292) et D) *L. citreum* en milieu MRS supplémenté en saccharose, D1) vue globale (x 4753), D2) vue agrandie (x 25749)

2.1.3 Spectroscopie infrarouge (ATR-FTIR)

Les différents biofilms ont été analysés de manière globale via la spectroscopie vibrationnelle infrarouge. Cette technique rapide d'analyse *in situ* a été choisie afin d'obtenir des informations sur les composés matriciels présents dans les biofilms, bien qu'elle tienne compte de l'ensemble des éléments du biofilm. Elle a été préférée à une analyse *ex situ* des composés matriciels, qui nécessite, une étape préalable d'extraction (voir p.78) puis de dosage biochimique des composés extraits (polysaccharides, protéines, ADN...), dont les résultats sont fortement dépendants des méthodes (extraction, dosage) utilisées.

En parallèle des biofilms, trois autres types d'échantillons ont été analysés à titre de comparaison :

- la membrane d'esters de cellulose non inoculée
- des cellules planctoniques des deux souches étudiées (culot cellulaire)
- la fraction purifiée de dextrans produite par *L. citreum* en présence de saccharose en condition planctonique.

Le profil d'absorbance de la membrane d'esters de cellulose stérile comporte quatre pics principaux caractéristiques, à 1640 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} et à 840 cm^{-1} (en gris et en pointiller sur la Figure 59).

Dans le cas des biofilms, deux zones principales de forte absorbance sont observées : dans la zone caractéristique des protéines, de 1700 à 1500 cm^{-1} , et dans celle des polysaccharides et des acides nucléiques, de 1200 à 1000 cm^{-1} (Figure 59). Dans la zone correspondant aux protéines, on peut distinguer un pic à 1640 cm^{-1} (amide I) dû à l'élongation des liaisons C=O des amides couplée à la déformation des liaisons -H, pour lequel il y a également une contribution de la membrane, ainsi qu'un pic à environ 1540 cm^{-1} (amide II) dû à la déformation des liaisons N-H et à l'élongation des liaisons C-N qui est absent du profil de la membrane seule (Quilès et al. 2010; Humbert and Quilès 2011).

Le pic à 1280 cm^{-1} , zone caractéristique des liaisons esters présentes dans la membrane, ainsi que celui à 840 cm^{-1} ne sont plus observés, ou de très faible intensité, après développement des trois différents biofilms sur les membranes, indiquant un recouvrement total du support par les biofilms, comme cela a déjà été suggéré par les observations en MEB.

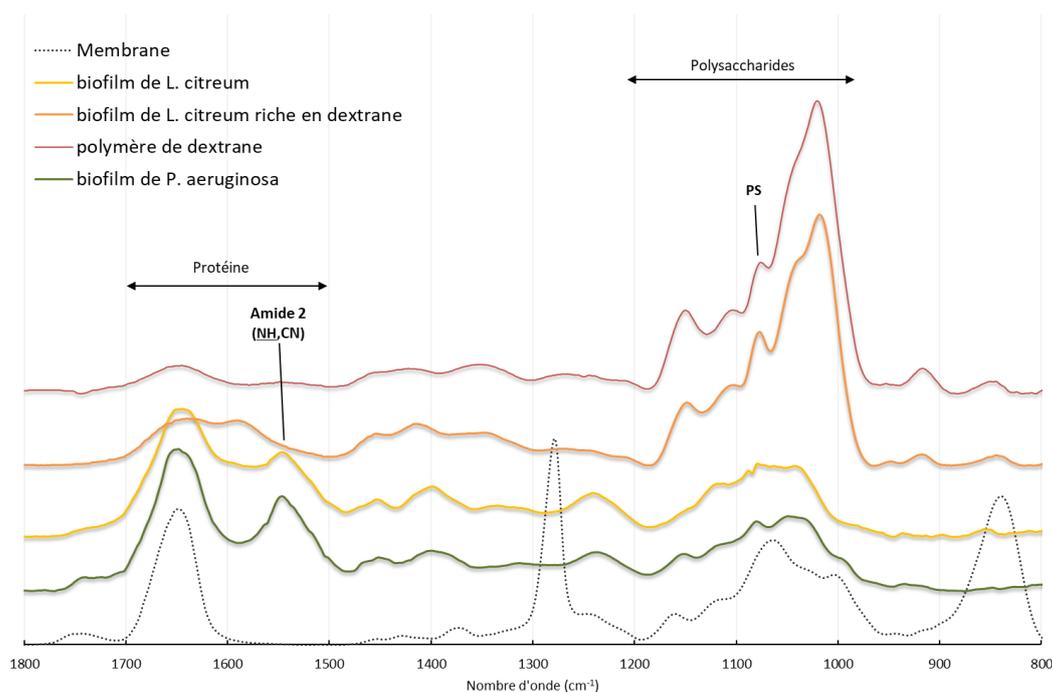


Figure 59 : Spectres FTIR des biofilms et des cellules planctoniques normalisés de *L. citreum* et *P. aeruginosa* (somme des valeurs d'absorbance des spectres soit égale à 1). Spectre de la membrane d'estér de cellulose (gris), les biofilms de 24 h de *P. aeruginosa* (vert), de *L. citreum* (jaune), de *L. citreum* formé en présence de saccharose (orange) et le polymère de dextrane (rouge)

Ainsi, le pic à 1280 cm^{-1} est celui qui permet de différencier au mieux le signal de la membrane par rapport à ceux des biofilms, et présente en même temps l'absorbance la plus importante pour la membrane. Il a donc été retenu pour normaliser les spectres de façon à comparer les différents spectres en eux (Figure 60, Figure 61 et Figure 62).

Comme proposé par (Khan et al. 2016) et (Tareb et al. 2017), la contribution des protéines par rapport aux polysaccharides a pu ensuite être évaluée par le calcul du rapport d'intensité du pic amide II (1540 cm^{-1}) sur celle du pic à 1070 cm^{-1} , caractéristique des polysaccharides (Tableau 11).

Le biofilm de *L. citreum* formé sur milieu MRS présente une empreinte spectrale proche de celle des cellules planctoniques de cette même souche, avec une forte contribution des protéines et des polysaccharides qui sont en proportion équivalente ($\text{AmII/PS} = 1,14 \pm 0,04$).

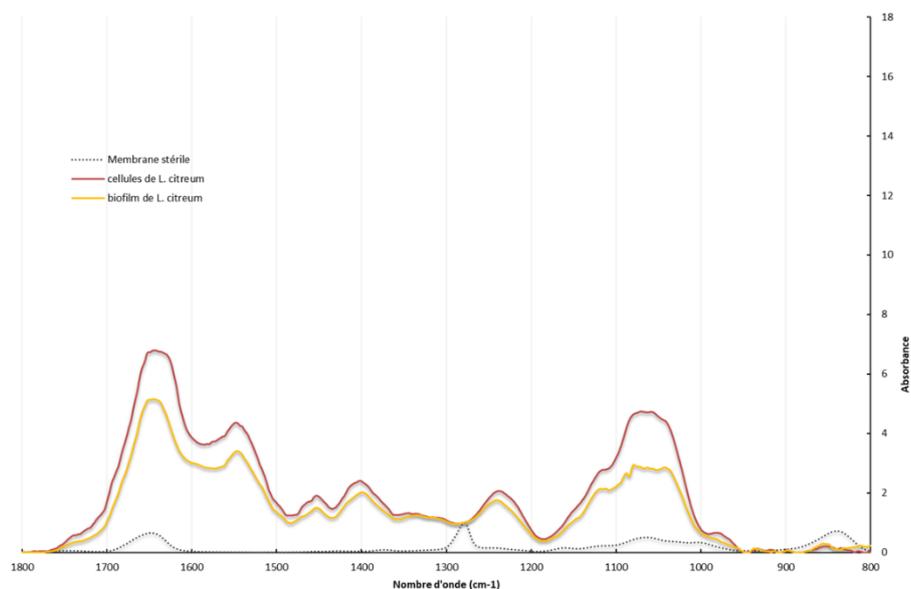


Figure 60 : Spectres FTIR normalisés à 1280 cm^{-1} des cellules planctoniques de *L. citreum* et des biofilms formés sur milieu MRS

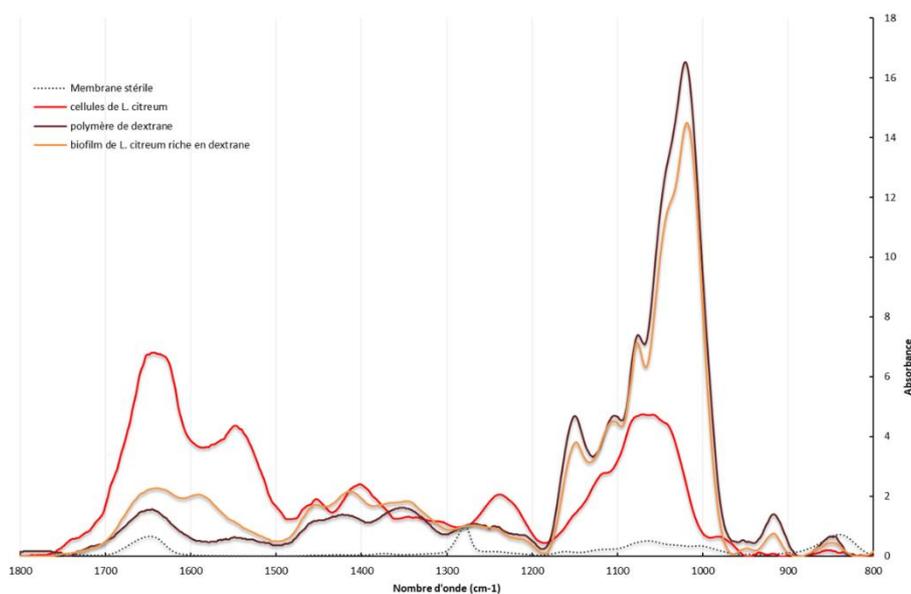


Figure 61 : Spectres FTIR normalisés à 1280 cm^{-1} des cellules planctoniques de *L. citreum* et des biofilms formés sur milieu MRS supplémenté en saccharose

Le biofilm de *L. citreum* formé en présence de saccharose comporte une grande proportion de polysaccharides, visualisables sous forme de pics intenses allant de 1200 à 1000 cm^{-1} . La valeur du rapport A_{1111}/PS est bien évidemment dans ce cas très largement en faveur des polysaccharides ($0,15 \pm 0,01$). L'analyse d'un échantillon de glucanes purifiés produits par cette même souche en condition planctonique montre une empreinte spectrale similaire à celle du biofilm (coefficient de corrélation de 95 %).

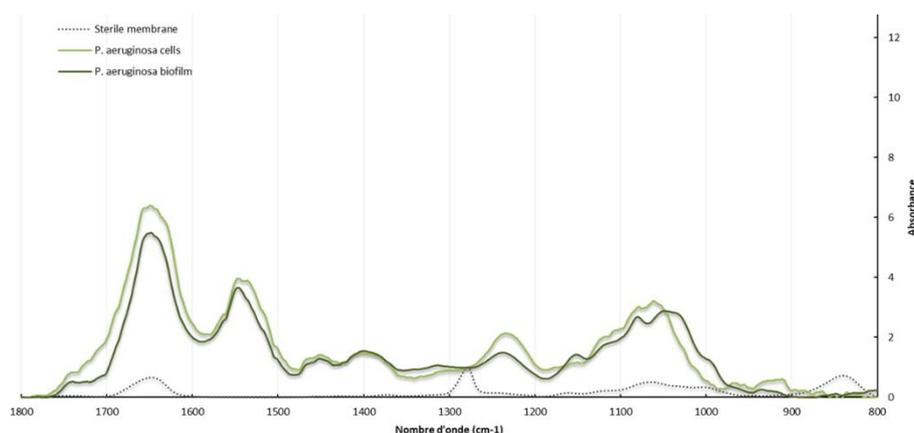


Figure 62 : Spectres FTIR normalisés à 1280 cm^{-1} des cellules planctoniques de *P. aeruginosa* et des biofilms formés sur milieu LB

Le biofilm de *P. aeruginosa* présente également une empreinte spectrale proche de celle des cellules planctoniques de cette même souche (% corrélation = 88%). Il comporte une proportion plus élevée en protéines ($A_{1540}/PS = 1,39 \pm 0,04$) que le biofilm de *L. citreum* (Tableau 6). Cette richesse en protéines est en accord avec des résultats antérieurs réalisés au laboratoire. En effet dans des conditions de biofilms immergés en microplaques, les protéines totales sont environ cinq fois plus abondantes que les polysaccharides (avec environ $40\ \mu\text{g}_{\text{eq } \kappa\text{-caseine}}/\text{puits}$ de protéines et $7\ \mu\text{g}_{\text{eq dextrane}}/\text{puits}$ de polysaccharides) dans le biofilm de 24 h de *P. aeruginosa* (Randrianjatovo-Gbalou 2016). On peut également noter que globalement l'empreinte spectrale de ce biofilm est relativement proche de celle obtenue pour les biofilms de *L. citreum*, malgré le choix initial de ces deux souches pour leurs propriétés pariétales et matricielles variables, et malgré les différences relevées notamment en microscopie électronique et par mesure de la matière sèche.

Tableau 11 : Rapport des protéines (pic amide II, 1540 cm^{-1}) sur les polysaccharides (1070 cm^{-1})

	A ₁₅₄₀ /PS	
	Moyenne	Écart-type
Membrane stérile	0,01	-
Cellules de <i>L. citreum</i>	0,89	-
Cellules de <i>P. aeruginosa</i>	1,30	-
Polymère de dextrane	0,08	-
Biofilm de <i>L. citreum</i> sur MRS	1,14	0,04
Biofilm de <i>L. citreum</i> sur MRS+S	0,15	0,01
Biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	1,39	0,04

2.2 Composés matriciels

Les techniques de caractérisation de la biomasse totale précédemment utilisées (biomasse totale, microscopie à balayage, spectroscopie infrarouge) ont apporté des premiers éléments sur la composition matricielle des biofilms. Cependant, pour approfondir ces informations, en particulier en ce qui concerne l'ADN extracellulaire, la microscopie confocale à balayage laser et le dosage et la visualisation de l'ADNe en gel d'agarose ont été utilisés.

À noter que la microscopie confocale à balayage laser n'a pas pu être utilisée pour les biofilms de 24 h de *L. citreum* (formés en présence ou non de saccharose). En effet, lors de l'étape préalable de fixation au formaldéhyde, et en particulier au moment des rinçages, une grande partie de ces biofilms a été décrochée, ce qui n'a pas permis de réaliser les marquages.

2.2.1 Analyse du biofilm de *P. aeruginosa* par microscopie confocale à balayage laser

Le marquage au PAS a montré que les exopolysaccharides sont localisés essentiellement à la surface des cellules (Figure 63). Les polysaccharides à l'origine de cette réponse pourraient être les composés pariétaux et/ou le Psl qui est connu pour être en effet fortement associé aux cellules (Hauser and Ozer 2011; Jennings et al. 2015; Maunders and Welch 2017). En revanche, la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* ATCC 15442 semble comporter très peu d'exopolysaccharides dont l'alginate. En effet, ce dernier est bien révélé par un marquage au réactif de Schiff (Randrianjatovo-Gbalou 2016); sa présence devrait donc être observée au niveau extracellulaire, ce qui n'est pas le cas ici et est en accord avec le fait que la souche ATCC 15442 soit une souche non mucoïde.

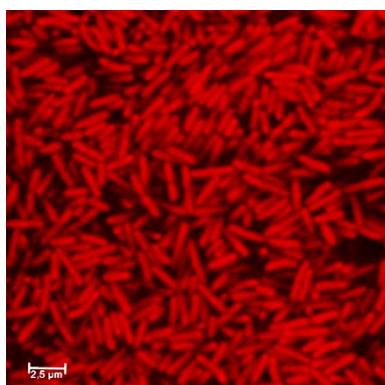


Figure 63 : Image de microscopie confocale à balayage laser d'un biofilm de 24 h de *P. aeruginosa*. Les exopolysaccharides sont marqués au PAS (réactif de Schiff). Objectif 63x à immersion dans l'huile, Leica SP2 AOBS.

Le marquage à l'épicoconone a montré que les protéines sont présentes sur l'ensemble de l'échantillon, réparties de façon homogène dans le biofilm. En effet, le marquage est diffus et ne permet pas de différencier les composantes cellulaire et matricielle de façon nette (Figure 64-A).

Les résultats obtenus pour ces deux types de marquage semblent aller dans le même sens que l'analyse par spectroscopie infrarouge du biofilm de *P. aeruginosa* qui montrait une plus forte proportion en protéines par rapport aux polysaccharides (p.149).

Le marquage de l'ADN extracellulaire avec le marqueur TOTO-1 a permis d'observer une forte réponse, la fluorescence apparaissant exclusivement à l'extérieur des cellules bactériennes (Figure 64-B). Ces observations sont en accord avec des résultats obtenus précédemment au laboratoire sur des biofilms immergés de cette même souche de *P. aeruginosa* formés en microplaque (Randrianjatovo-Gbalou 2016). De façon plus générale, la présence d'ADNe dans le biofilm de *P. aeruginosa* est bien décrite dans la littérature (Whitchurch et al. 2002) ; il joue un rôle important dans la fixation, l'agrégation, la stabilisation et la maturation du biofilm (Okshevsky and Meyer 2013).

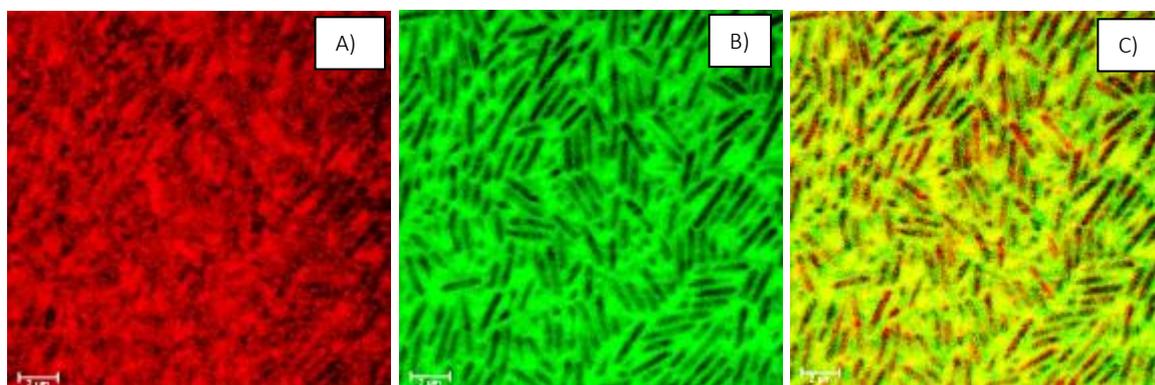


Figure 64 : Images de microscopie confocale à balayage laser du biofilm de 24 h de *P. aeruginosa* ; A) marquage des protéines via le marqueur Epicocconone (rouge), B) marquage de l'ADNe avec le marqueur TOTO-1 (vert) et C) superposition des marquages des protéines (Epicocconone, rouge) et de l'ADNe (TOTO-1, vert). Objectif 63x à immersion dans l'huile, Leica SP2 AOBs.

2.2.2 Analyse biochimique *ex situ* de l'ADN extracellulaire

Pour approfondir l'analyse de l'ADN extracellulaire des biofilms, sa présence a été recherchée dans les fractions solubles des différents biofilms-modèles de 24 heures calibrés à environ 10^8 UFC.cm⁻² (surnageants obtenus après une simple étape de centrifugation du biofilm après

sa remise en suspension dans de l'eau physiologique). Les contrôles réalisés au moyen de membranes non inoculées mais incubées et traitées comme les biofilms ont permis d'exclure la contamination des surnageants par de l'ADN provenant des composés des milieux de culture (Figure 65).

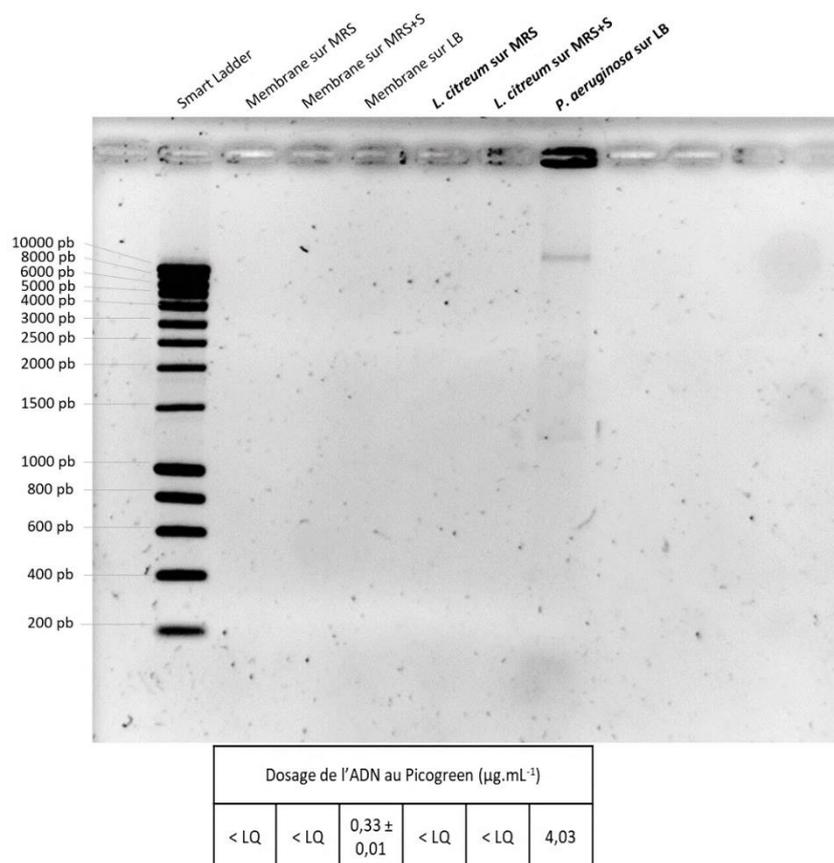


Figure 65 : Détection et dosage de l'ADN extracellulaire dans les surnageants issus des différents biofilms de 24 h (migration en gel à 1% d'agarose). Dosage de l'ADNe réalisé avec le marqueur fluorescent Picogreen ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). LQ : limite de quantification

En accord avec les observations en microscopie confocale à balayage laser de la matrice de *P. aeruginosa*, de l'ADN a été pu être mis en évidence après dépôt direct du 'surnageant biofilm' dans un gel d'agarose (Figure 65). L'ADN visualisé correspond à une fraction de très grande taille (> 10 kb, et au niveau du puits de dépôt). Ceci est donc en faveur de la présence, en quantité importante, d'ADN extracellulaire dans la matrice du biofilm de *P. aeruginosa*. Un dosage au Picogreen a permis de déterminer que la quantité d'ADN dans cet échantillon est de l'ordre de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Par ailleurs, une amplification PCR avec des amorces spécifiques de *P. aeruginosa* de cette fraction de surnageant a confirmé qu'il s'agit bien d'ADN génomique de *P. aeruginosa*, avec l'obtention d'un seul type d'amplicon à la taille attendue (Figure 66-A).

Ce même type d'approche a été réalisé sur un surnageant obtenu à partir de biofilms de 24 h de *L. citreum* (\pm saccharose), pour lequel nous n'avons pas pu réaliser d'analyses en microscopie confocale à balayage laser. Dans ce cas, aucune bande d'ADN n'a pu être visualisée directement en gel d'agarose à partir du surnageant obtenu à partir de ces biofilms (Figure 65). Le dosage de ces échantillons au Picogreen a conduit à l'obtention de valeurs inférieures au seuil de quantification ($0,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

En revanche, l'amplification avec des amorces spécifiques de cette espèce a permis l'obtention d'un amplicon à la taille attendue pour les deux types de biofilms de *L. citreum* (Figure 66-B). Ceci suggère donc que de l'ADN génomique de *L. citreum* est également présent dans la matrice des biofilms de 24 h de *L. citreum*, mais en très faible quantité puisqu'il ne peut être mis en évidence qu'après la forte amplification permise par l'utilisation de la méthode PCR. Très peu d'informations sont disponibles sur la nature et la proportion des exopolymères matriciels de biofilms de *L. citreum* NRRL B-1299, et la seule étude réalisée jusqu'à présent a mis en évidence de façon indirecte, par l'emploi d'enzymes hydrolytiques, un rôle des exopolysaccharides, des protéines et mais aussi de l'ADN dans la formation de biofilms (Badel et al. 2008).

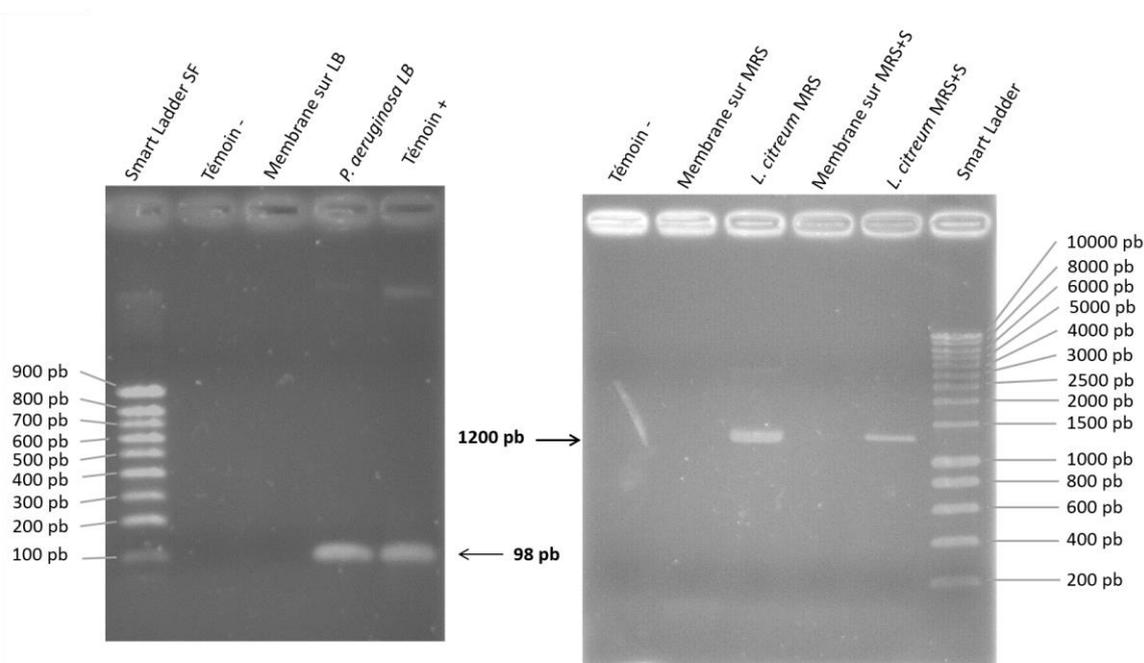


Figure 66 : Amplification PCR de l'ADN extracellulaire des surnageants des différents biofilms ; A) Amplification de *P. aeruginosa* (amorces Opr1/2) (migration en gel à 1% d'agarose), B) Amplification de *L. citreum* (LcitF/R) (migration en gel à 1,5% d'agarose)

3 Validation de l'effet biocide des dispositifs

La validation de l'effet biocide des deux dispositifs (jet de plasma et LED UV-C) a été réalisée sur la souche *L. citreum*. Ceci a consisté à :

- Valider que l'ensemble du coupon de 1,5 cm² de membrane sera dans la zone traitée ;
- Vérifier la faisabilité de détecter un effet biocide sur des biofilms de 24 h établis selon la méthodologie précédente (p. 118).

3.1 Système plasma

Dans un premier temps, l'effet antibactérien du jet de plasma corona a été évalué par la mesure du diamètre d'inhibition de croissance après une exposition de 10 min, et ceci avec 5 pointes neuves (anodes) différentes (Figure 67). Pour l'ensemble des 5 pointes testées, les diamètres d'inhibition de croissance sont compris entre 2,2 et 2,8 cm (Figure 68). Une exposition de 10 minutes du milieu de culture avant inoculation n'a aucun effet sur le développement bactérien (visualisation d'un tapis bactérien identique à celui d'un témoin non traité). Comme on peut le voir sur la Figure 67-B, l'action antibactérienne du plasma est perceptible au-delà de la zone d'inhibition centrale, avec la visualisation de colonies isolées, laissant supposer une diffusion d'espèces réactives dans le milieu de culture.

L'effet biocide du traitement plasma est ainsi validé, et le diamètre d'inhibition estimé est supérieur à la taille des carrés de membrane (1,5 cm²) sur lesquels sont développés les biofilms.

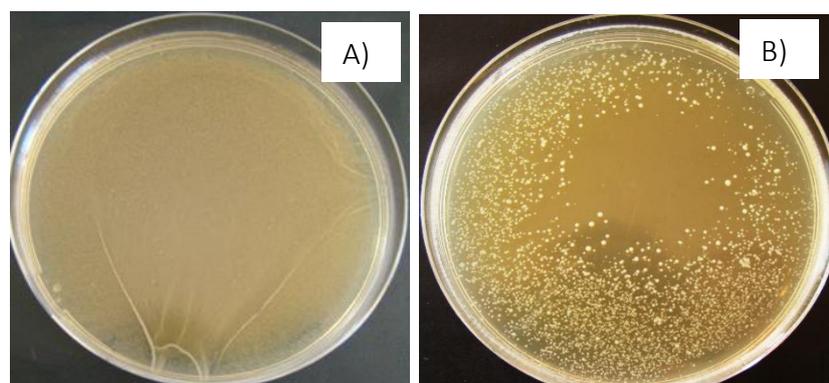


Figure 67 : Visualisation de l'effet du traitement avec le jet de plasma corona sur des cellules planctoniques de *L. citreum* déposées sur MRS, A) Témoin non traité B) Traitement de 10 min au jet de plasma corona.

De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes pointes testées (ANOVA suivie d'un test de Kruskal–Wallis, $p < 0,05$). La pointe numéro 1 a présenté les résultats les plus reproductibles et une des plus fortes inhibitions (proche de 3 cm de diamètre) ; elle a donc été retenue pour la suite de l'étude.

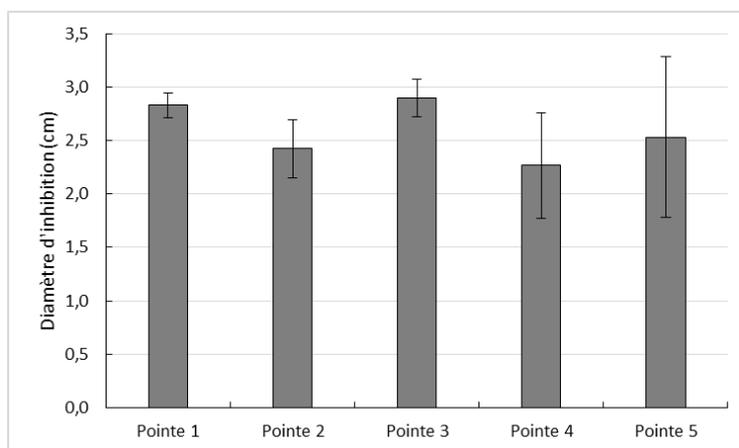


Figure 68 : Test de différentes pointes de 20 μm du Jet corona par la méthode du diamètre d'inhibition sur la souche *L. citreum* ($n=3$). Analyse ANOVA suivie d'un test de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$)

Des biofilms de 24 h de *L. citreum* formés sur membrane esters de cellulose ont également été traités pendant 5, 10 et 20 min en triplicat. L'effet biocide du jet de plasma sur des biofilms de 24 h de *L. citreum* a ainsi également été validé, avec une réduction d'environ 0,8 \log_{10} dès 5 min de traitement et atteignant 1,6 \log_{10} après 10 min (Figure 69). Un temps de traitement plus long (40 min) n'a pas conduit à une réduction plus importante de la population bactérienne. Ces valeurs sont légèrement plus faibles que celles obtenues par Marchal *et al.* 2012 dans le cas de la souche *W. confusa* (réduction logarithmique de $2,6 \pm 0,8 \log_{10}$ pour ce même temps de traitement et pour une concentration bactérienne équivalente), mais ceci peut s'expliquer par les différences mentionnées précédemment au niveau du dispositif (voir p. 130), notamment la distance plus faible (1 cm au lieu de 2 cm) entre l'extrémité de la pointe et l'échantillon.

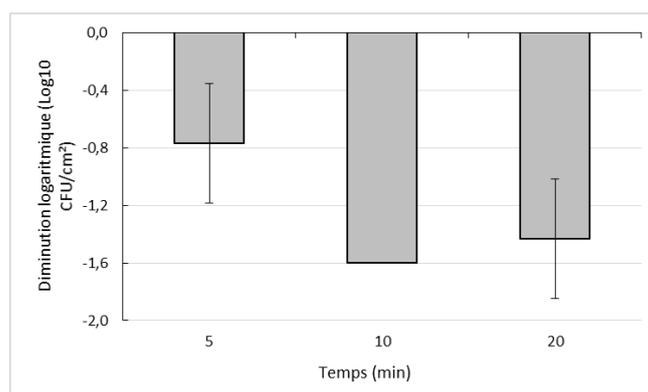


Figure 69 : Efficacité biocide du jet de plasma corona sur biofilm de *L. citreum* (n=3)

3.2 Système LED UV-C

Un premier choix initial a été de tester deux LED UV-C émettant respectivement à 260 nm et à 280 nm, ces longueurs d'onde représentant le maximum d'absorption respectivement des acides nucléiques (ADN et ARN) et des protéines.

De la même façon que pour le jet de plasma, les deux LED UV-C ont donc été utilisées pour exposer pendant 10 minutes des cellules de *L. citreum* étalées en surface de gélose MRS.

Les résultats obtenus (Figure 70 et Figure 71) montrent que le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne est reproductible et de l'ordre de 2 cm, pour les deux types de LED. Tout comme dans le cas du traitement plasma, cet essai préliminaire indique que la zone de traitement effectif couvre les 1,5 cm² des coupons de membrane utilisés pour la formation et le traitement des biofilms. Une irradiation du milieu de culture avant inoculation n'a aucun effet sur le développement bactérien (visualisation d'un tapis bactérien identique à celui du témoin).

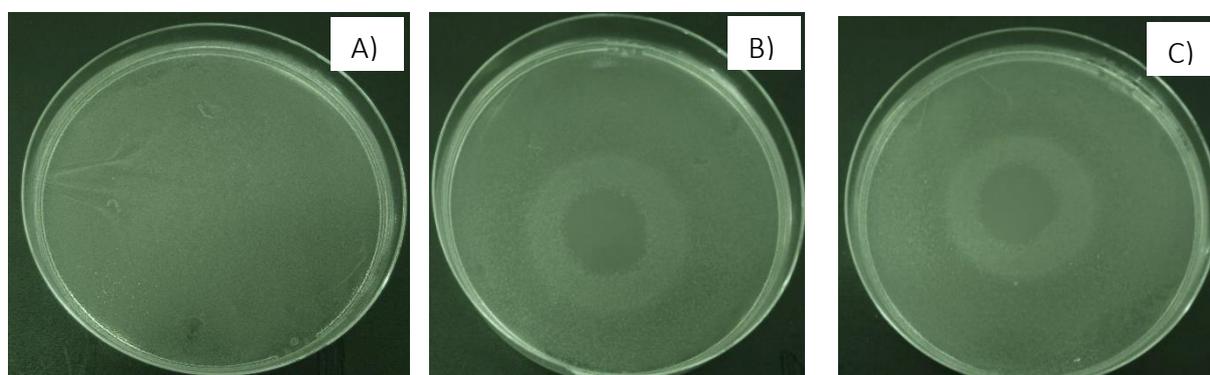


Figure 70 : Diamètre d'inhibition de cellules planctoniques de *L. citreum* traitées avec les LED dans l'UV-C, A) Témoin non traité, B) Utilisation de la LED à 280 nm, C) Utilisation de la LED à 260 nm

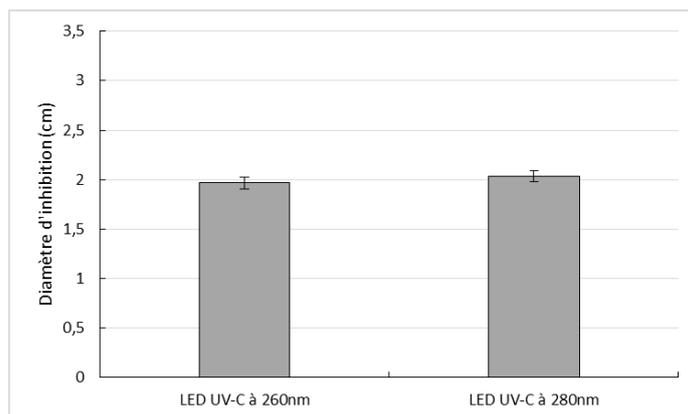


Figure 71 : Diamètre d'inhibition de culture de *L. citreum* traité 10 min avec les LED à 260 et 280 nm (n=3)

Les deux LEDs ont également été testées sur des biofilms de 24 h de *L. citreum*, à 3 temps d'irradiation (5, 10 et 20 min) sur 3 coupons issus d'une même membrane ; le 4^{ème} coupon était utilisé comme témoin non traité. Les résultats, issus de trois répétitions, sont exprimés en diminution logarithmique de la population bactérienne par rapport au témoin non traité (Figure 72).

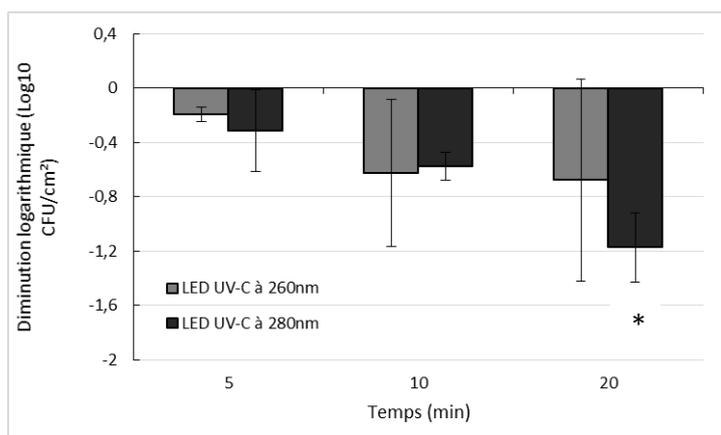


Figure 72: Efficacité biocide des LED UV-C sur le biofilm de *L. citreum* (n=3). Analyse ANOVA suivie d'un test de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$)

Les résultats obtenus pour la LED à 260 nm sont peu reproductibles, avec une très grande variabilité de réponse observée à 10 et 20 min de traitement, ce qui ne permet pas d'observer d'effet biocide significatif sur les biofilms 24 h de *L. citreum*. En ce qui concerne la LED à 280 nm, les résultats sont plus reproductibles, mais seule la réduction logarithmique après 20 min d'irradiation (environ 1,2 log₁₀) est statistiquement différente du témoin.

Cette différence d'efficacité des 2 LED peut être imputée à leur différence de puissance nominale (1 mW et 2 mW) et donc à la dose reçue par l'échantillon. Dans le cas de la LED à 280 nm, la dose reçue correspond respectivement à 660, 1320 et 2640 mJ.cm² pour les trois temps de traitement (durée d'exposition de 5, 10 et 20 min), alors qu'elle n'est que de la moitié

de ces valeurs dans le cas de la LED à 260 nm. Ces résultats concordent avec ceux de Bowker *et al.* 2011 qui ont montré, dans le cas de suspensions d'*Escherichia coli*, que l'efficacité biocide d'une LED UV émettant à 275 nm était supérieure à celle d'une LED UV émettant à 255 nm (Bowker *et al.* 2011). Ainsi, seule la LED à 280 nm a été retenue pour la suite de l'étude.

4 Conclusion

La méthode de formation de biofilms développée lors de ces travaux garantit la formation de biofilms **homogènes** et **reproductibles** sur des membranes d'esters de cellulose. Le choix de découper la membrane en 4 coupons, et d'utiliser systématiquement un de ces coupons comme témoin non traité permet de disposer d'un réel **témoin interne** et de limiter les différences de charge microbienne entre le témoin et les essais avant traitement. C'est d'ailleurs une des modifications réalisées par rapport à la méthodologie précédemment utilisée au laboratoire (Marchal *et al.* 2012). Les biofilms de 24 h étaient alors formés sur la membrane entière, puis un coupon de 1,5 cm² était découpé et déposé à la surface d'une nouvelle boîte de milieu gélosé. Outre la plus grande difficulté de réalisation, il y avait de ce fait des variations plus ou moins importantes de charge microbienne initiale entre les échantillons subissant un traitement d'inactivation.

La **maitrise du dépôt de la charge bactérienne** rend la comparaison des effets sur les biofilms possible pour une même espèce bactérienne mais aussi entre les deux espèces étudiées. De plus, la méthode de formation des **biofilms aériens en surface d'un milieu de culture** permet de traiter directement les biofilms, sans aucune manipulation avant l'application du traitement. Enfin, les dispositifs de traitement plasma et LED semblent avoir un effet biocide sur une zone supérieure à la taille des coupons issus des membranes utilisées pour la formation des biofilms. Par ailleurs, la caractérisation des biofilms par différentes approches a permis de confirmer la diversité des trois types de biofilms formés que ce soit en termes de biomasse totale ou de composition matricielle. Ainsi, la souche de *P. aeruginosa* forme des biofilms riches en ADNe et avec une prédominance de protéines par rapport aux polysaccharides. Les biofilms de *L. citreum* formés sur milieu MRS présentent une matrice très peu développée, avec quasiment autant de protéines que de polysaccharides. Enfin, lorsque cette souche est cultivée en milieu MRS supplémenté en saccharose, les biofilms présentent une matrice très riche en exopolysaccharides de type glucanes.

Chapitre II
Évaluation de l'effet biocide d'un jet de
plasma froid sur des biofilms bactériens
modèles

Ce chapitre concerne **l'étude de l'inactivation des différents biofilms bactériens modèles par le prototype de jet de plasma froid** développé par l'équipe PRHE du Laplace de Toulouse.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les deux souches modèles *P. aeruginosa* ATCC 15442 et *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 permettent de former trois types de biofilms ayant des caractéristiques matricielles différentes dans la mesure où *L. citreum* produit des glucanes extracellulaires lorsque le milieu de culture est supplémenté en saccharose.

L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer l'efficacité biocide du dispositif jet de plasma froid sur des biofilms de 24 heures formés sur membrane d'esters de cellulose et standardisés en termes de densité cellulaire à 10^8 CFU.cm⁻², mais différents en termes de matrice extracellulaire.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 sur milieu LB
- *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 sur milieu MRS.
- *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 sur milieu MRS additionné de saccharose.

Des échantillons correspondant à des cellules déposées sur membrane (SSB), en quantité permettant la formation des biofilms de 24 heures, ont également été inclus dans cette analyse, pour les deux souches étudiées.

Les résultats de cette étude sont détaillés dans l'article : « *Response of controlled cell load biofilms to cold atmospheric plasma jet : evidence of extracellular matrix contribution* » en cours de révision dans « *Journal of Applied Microbiology* ». Cet article présente également des éléments de caractérisation des différents biofilms et des espèces réactives produites par le plasma qui ont été décrits dans les parties précédentes.

Principaux résultats

L'exposition de cellules déposées sur membrane (SSB) par le jet de plasma pendant 5, 10 ou 20 minutes a révélé un effet antimicrobien significatif pour *P. aeruginosa* et *L. citreum* (Figure 4). Cet effet est fonction du temps d'exposition et est similaire pour les deux souches étudiées. La population bactérienne a été réduite de manière significative dès 5 min de traitement (réduction d'environ 1,5 log₁₀), avec un effet maximal atteignant une diminution d'environ 2,5 log₁₀ après une exposition de 20 min.

En ce qui concerne les biofilms, dont les densités cellulaires avant traitement ne sont pas significativement différentes, aucun effet biocide n'a été observé dans le cas de *P. aeruginosa*

(Figure 5-A) et de *L. citreum* en présence de saccharose (matrice riche en glucanes) (Figure 5-B). En revanche, pour le biofilm de *L. citreum* formé en l'absence de saccharose dans le milieu, un effet dose est observé comme pour les SSB, mais avec un effet biocide significatif observé seulement après 20 min de traitement, et une réduction de la population bactérienne de $1,5 \log_{10}$ (Figure 5-B). Les résultats obtenus avec les deux biofilms de *L. citreum* montrent bien, pour la première fois, que la matrice du biofilm protège les cellules bactériennes des espèces réactives générées par le jet de plasma.

L'analyse des spectres infrarouges normalisés sur le pic de la membrane à 1280 cm^{-1} obtenus pour les biofilms avant et après 20 min de traitement a permis de mettre en évidence (Figure S1) :

- l'absence de modifications notables sur l'ensemble du spectre dans le cas de *L. citreum* en présence de saccharose ;
- une diminution relative des pics amides I et II (1500 à 1700 cm^{-1}) par rapport aux pics caractéristiques des polysaccharides (1070 cm^{-1}) pour les biofilms de *P. aeruginosa* et ceux de *L. citreum* cultivés en absence de saccharose, se traduisant par une diminution de l'ordre 30 à 40 % du ratio protéines /polysaccharides utilisé comme critère de caractérisation des biofilms (Table 2)

Discussion

Si les mécanismes exacts sous-jacents à l'inactivation des bactéries par plasma froid sont encore méconnus, il est cependant admis que l'effet antimicrobien des plasmas froids est dû à la production de diverses espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) (Mai-Prochnow et al. 2014; Liao et al. 2017; Flynn and Gilmore 2018). Il s'agit des espèces réactives générées par l'effluent de plasma en lui-même, qui ont été mises en évidence expérimentalement, mais surtout de leurs sous-produits formés au contact de l'air et de l'échantillon traité, d'autant plus dans un contexte fortement hydraté tel que le biofilm. Les RONS sont bien connues pour présenter de fortes propriétés oxydantes et sont capables d'altérer l'ensemble des macromolécules biologiques (protéines, lipides, acides nucléiques et polysaccharides) (Duan and Kasper 2011). L'action des RNOS peut ainsi se traduire par des modifications intracellulaires responsables de l'effet biocide, mais aussi, dans le cas des biofilms, interagir en premier lieu avec les composés matriciels.

Ici, le traitement de cellules déposées sur membrane (SSB) par le dispositif plasma a révélé un effet biocide significatif, dépendant du temps de traitement. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de travaux antérieurs du laboratoire portant sur l'inactivation de la bactérie lactique *Weissella confusa* par un système jet de plasma proche de celui utilisé lors de cette étude (Marchal et al. 2012). Les niveaux d'inactivation sont en effet du même ordre de grandeur, avec une réduction de la population bactérienne d'environ $1,5 \log_{10}$ après 10 minutes de traitement et une réduction maximale atteinte après 20 minutes de traitement. Dans le cas présent, nous n'avons pas observé de plus grandes sensibilités pour la souche à Gram négatif (*P. aeruginosa*) par rapport à la souche à Gram positif (*L. citreum*). En effet, il est souvent avancé que les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles à un traitement plasma du fait notamment d'une plus faible épaisseur de peptidoglycane dans leur paroi cellulaire (Flynn et al. 2015; Mai-Prochnow et al. 2016). Toutefois, nos résultats sont en accord avec d'autres études qui ne révèlent pas non plus de plus grandes résistances des bactéries à Gram⁻ (Lu et al. 2014; Liao et al. 2017; Helgadóttir et al. 2017). En effet, d'autres facteurs tels que l'épaisseur totale de la paroi et les autres composés de l'enveloppe cellulaire peuvent également être pris en compte (Han et al. 2015).

Lors du traitement des biofilms de 24h, une réduction significative de la population bactérienne n'est observée que pour les biofilms de *L. citreum* formés sur milieu MRS, ceux dont la biomasse est la plus faible. Même au temps maximal de 20 minutes de traitement, aucune action bactéricide n'a été mise en évidence pour les biofilms de *P. aeruginosa* et ceux de *L. citreum* riches en glucanes. Ceci est en accord avec une étude sur la sensibilité de biofilms de *Burkholderia cepacia* montrant que les isolats cliniques produisant la plus grande quantité de biomasse sont plus tolérants à l'effet biocide d'un traitement plasma (Alshraideh et al. 2016). Dans le même sens, il a été montré très récemment que l'efficacité d'inactivation de biofilms de 24h, 48h et 72h d'*Acinetobacter baumannii* par un jet de plasma (hélium/oxygène) est réduite pour les biofilms ayant la biomasse la plus importante, biomasse évaluée par coloration au Crystal Violet (Flynn et al. 2019).

La comparaison directe des effets du plasma entre les SSB et les biofilms est délicate. En effet, en raison du protocole utilisé et de la différence de croissance des deux souches, le niveau de population bactérienne n'est pas identique entre les deux modalités (environ 40 fois moins pour *L. citreum* et 200 fois moins pour *P. aeruginosa* dans le cas des SSB). Or, l'effet de la densité cellulaire a déjà été rapporté comme réduisant l'efficacité d'un traitement plasma sur

des suspensions bactériennes (Kamgang-Youbi et al. 2008; Joshi et al. 2010; Fernández et al. 2012). L'inefficacité du plasma dans le cas des biofilms par rapport aux SSB pourrait ainsi être attribuée à la fois à une charge microbienne plus élevée et/ou à la présence de composés matriciels. De plus, l'état métabolique entre des cellules planctoniques en phase stationnaire de croissance simplement déposées sur membrane et des cellules en biofilm de 24 h est certainement différent et peut donc entraîner des réponses cellulaires différentes lors de l'exposition au plasma. A noter que le traitement de la modalité SSB avec différentes densités cellulaires, et notamment une densité identique à celle des biofilms, était prévu initialement afin de discriminer les effets de densité cellulaire et de matrice. Cependant, ces expérimentations n'ont pu être réalisées du fait d'un dispositif plasma non fonctionnel pendant une longue période.

Si cette contrainte technique ne permet pas de comparer directement les états SSB et biofilm, la comparaison des biofilms entre eux a été rendue possible par la maîtrise de la densité des cellules pour les trois biofilms à 10^8 CFU.cm⁻² (avec des densités cellulaires non significativement différentes) et de leurs biomasses respectives, du fait du choix initial des souches et de la méthodologie développée pour la formation des biofilms. Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude ont mis en évidence la contribution de la matrice dans la réponse au traitement plasma, en particulier pour *L. citreum* : les biofilms formés sur milieu avec ou sans saccharose (i.e. avec ou sans production de glucanes extracellulaires) présentent une masse sèche différente d'un facteur 4, et les résultats indiquent clairement que la présence de glucanes dans la matrice altère l'efficacité du traitement plasma. Des études antérieures réalisées au laboratoire (Marchal et al. 2012) semblaient déjà indiquer un effet protecteur de la matrice dû à la production de dextrans pour des biofilms de *Weissella confusa* formés sur milieu avec ou sans saccharose (biofilm riche ou non en glucanes) ; cependant, la densité bactérienne des deux types de biofilms n'était pas équivalente et la réduction de la viabilité n'était pas significativement différente entre les deux types de biofilms. On peut émettre l'hypothèse que la présence de glucanes soit impliquée dans le piégeage des espèces réactives de l'oxygène produites, permettant ainsi de limiter l'impact du stress oxydatif sur les cellules bactériennes. Dans ce sens, il a d'ailleurs été montré récemment chez l'espèce voisine *L. mesenteroides* que la synthèse de glucanes extracellulaires permet de réduire l'accumulation de ROS dans les cellules bactériennes et d'ainsi améliorer leur survie lors de l'application d'un stress oxydatif chronique (Yan et al. 2016). D'autres polysaccharides, dont l'alginate, ont

également été décrits comme capables de séquestrer les radicaux hydroxyl (OH⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Gambino and Cappitelli 2016).

Par ailleurs, même en dehors de toute action biocide comme dans le cas des biofilms de *P. aeruginosa*, nous avons pu observer une altération de la fraction protéique du biofilm suite au traitement plasma, évaluée par une diminution de l'ordre de 30 % du ratio Amide II/PS en spectroscopie infrarouge. Ceci peut être mis en relation avec des résultats publiés par (Khan et al. 2016) qui ont montré par le même type d'analyse ATR-FTIR une réduction de 10 à 20 % du ratio AmII/PS après avoir exposé trois biofilms différents à un réacteur plasma DBD permettant d'éradiquer 90 % de la population bactérienne. Les stress oxydatifs sont décrits depuis de nombreuses années pour avoir des effets sur les protéines (Surowsky et al. 2016) et il d'ailleurs été montré que l'application d'un traitement plasma sur des protéines purifiées entraîne diverses modifications structurales (Hosseinzadeh Colagar et al. 2013; Lackmann and Bandow 2014).

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent que le protocole de calibration des biofilms proposés constitue une amélioration par rapport à l'existant, par le contrôle de la densité cellulaire et l'utilisation d'une souche à matrice « inductible » qui permet d'apporter des éléments nouveaux sur l'effet protecteur de la matrice. Ils indiquent de plus que la matrice des biofilms de *P. aeruginosa*, riche en ADNe et protéines, et de *L. citreum*, riches en glucanes, joue très probablement un rôle dans la résistance au traitement plasma appliqué, en lien avec leur composition ou leur quantité. Si de nombreux auteurs ont avancé ce rôle protecteur de la matrice dans la réduction de l'efficacité des plasmas froids envers les biofilms, ces travaux l'ont montré sur le plan expérimental.

Response of controlled cell load biofilms to cold atmospheric plasma jet: evidence of extracellular matrix contribution

Maritxu Labadie¹, Frédéric Marchal², Nofel Merbahi², Elisabeth Girbal-Neuhauser¹, Catherine Fontagné-Faucher¹ and Claire-Emmanuelle Marcato-Romain^{1*}

1 Université de Toulouse ; UPS, IUT 'A', LBAE EA 4565 (Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale), 24 rue d'Embaquès, F-32000 Auch, France

2 Université de Toulouse ; UPS, INPT, LAPLACE UMR 5223 (Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie), 118 Route de Narbonne, F-31062, France

* Corresponding author

Email address: claire-emmanuelle.romain @iut-tlse3.fr

Phone: +33 5 62 61 63 05

Running Headline: Biofilm resistance to cold plasma

Abstract

Aims

To study the biocidal effect of a cold atmospheric-pressure plasma in ambient air on single-species bacterial biofilms with controlled cell density and characterised by different extracellular matrices.

Methods and results

Two bacterial strains were chosen to present different Gram properties and contrasted extracellular matrices: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Gram-negative), and *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (Gram-positive). *L. citreum* also presented the specificity to produce glucan-type exopolysaccharides when grown in the presence of sucrose. Plasma was applied on both surface-spread cells and 24-hour grown biofilms with controlled cell loads during 5, 10 or 20 minutes. Surface-spread bacteria showed a time dependent response, with a maximal bacterial reduction of 2.5 log after 20 minutes of treatment. On the other hand, no

bactericidal effect could be observed when treating biofilms of *P. aeruginosa* and glucan-rich *L. citreum*.

Conclusion

For biofilms presenting equivalent cell loads, the response to plasma treatment seemed to depend on the properties of the extracellular matrix characterized by infrared spectroscopy, scanning electron microscopy or dry weight.

Significance and Impact of Study

Both cell load standardization and biofilm characterization are paramount factors to consider the biocide effect of plasma treatments. The extracellular matrix could affect the plasma efficacy by physical and/or chemical protective effects.

Keywords: *P. aeruginosa*, *L. citreum*, bacterial survival, extracellular polymeric substances, ATR-FTIR, non-thermal plasma, biofilm, method standardization.

1. Introduction

Biofilms are microbial communities attached to a surface and embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances. Biofilms can colonize biotic or abiotic surfaces, hence leading to various detrimental effects in the medical, food and industrial sectors (Bridier et al., 2011). The extracellular matrix (ECM) consists of a fully hydrated cross-linked complex mixture of proteins, polysaccharides and extracellular DNA (eDNA). The biofilm matrix has diverse functions, such as maintaining the structural integrity of the biofilm and protecting cells from adverse environmental conditions (Flemming and Wingender, 2010). Moreover, biofilm cells are in a different physiologic state compared to planktonic cells, and it is well known that bacteria growing within a biofilm structure have a higher resistance to desiccation and antimicrobials, compared to their planktonic counterparts. This enhanced tolerance has been attributed to a slower metabolism, protective proteins, and the presence of the matrix itself which can provide a physical barrier to prevent the penetration of antimicrobials (Branda et al., 2005; Bridier et al., 2011).

Non-thermal plasma at atmospheric pressure, known as cold atmospheric-pressure plasma (CAP), is considered as an innovative biofilm control strategy, and is currently developing as an environmentally friendly method in order to reduce bacterial biofilms on surfaces (Gilmore et al., 2018). Plasma, considered as the fourth state of matter, is defined as a highly reactive

ionized gas with a net neutral charge. CAP can be experimentally generated by devices using an electric field and different noble gases, or even atmospheric air (Moreau et al., 2008; Lackmann and Bandow, 2014). A huge variety of different plasma sources has been developed, the majority of which are based either on a dielectric barrier discharge (DBD), corona or gliding arc discharges. Although the exact mechanism of CAP bactericidal action has still to be elucidated, it is nevertheless known that atmospheric air CAP is a source of multiple reactive species, including reactive oxygen (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), excited molecules and UV photons, and that these active species contribute to the antimicrobial properties of plasmas (Mai-Prochnow et al., 2014; Liao et al., 2017; Flynn and Gilmore, 2018). Due to its decontaminating properties, CAP technology has been adopted for a wide range of applications going from food safety to biomedical domains, including oral health, wound healing, sterilization and decontamination of inorganic and biomaterials (Yousfi et al., 2014; Pankaj et al., 2018). The bactericidal effect of CAP on planktonic bacteria has been widely investigated (Bourke et al., 2017; Liao et al., 2017), while only fewer reports are available for biofilm inactivation. CAP efficiency against biofilm forming bacteria was found less efficacious compared to planktonic bacteria, and the duration of the treatment was usually increased (Kamgang et al., 2007; Salamiou et al., 2009; Marchal et al., 2012; Puligundla and Mok, 2017). However, numerous factors could impact the comparison of inactivation rates and/or efficacy of CAP treatments between studies and should also be considered in order to have a better understanding of the involved mechanisms: (i) plasma-related factors such as the composition of discharge gas, voltage and frequency of power supply, distance between biofilm surface and plasma electrode; (ii) microbial-related factors including bacterial concentration, biofilm thickness, nature and structure of extracellular polymers (Bourke et al., 2017). For instance, several reports underlined a reduced plasma efficacy when bacterial concentrations increased, as for planktonic *E. coli* (Yu et al., 2006; Joshi et al., 2011; Judée et al., 2014) and *Salmonella Typhimurium* (Fernández et al., 2012). Therefore, standardizing biofilms in terms of cell density appears as a prerequisite in order to undertake relevant analysis of a CAP treatment efficacy and to investigate the role of the extracellular matrix and/or the cellular compartment on biofilm resistance.

We here selected two bacterial strains: i) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, a Gram-negative bacterium that is recommended as a standard model for testing antimicrobial preservatives under national regulatory standards NF EN1040 (AFNOR 2006) and ASTM

standards, and ii) *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299, a Gram-positive lactic acid bacterium which has the capacity to form thick biofilms due to the production of high-molecular weight dextrans in presence of sucrose (Bounaix et al., 2009; Passerini et al., 2015).

In this study, the main objectives were thus to: (i) develop a method to standardize the production of mono-species bacterial biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Leuconostoc citreum* (with glucan-rich matrix or not); (ii) investigate the influence of the extracellular matrix on the biofilm eradication potential of a plasma corona device operating in ambient air. Bacterial biofilms were standardized in term of cell load and were characterized using dry weight, scanning electron microscopy and ATR-FTIR spectroscopy. Bactericidal effect of the CAP treatment was then evaluated by conventional plate count method and correlated to biofilm properties. Overall results are expected to shed light on the potential implication of extracellular matrix compounds within biofilms in response to CAP treatments.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and cultivation method

The two bacterial strains used in this study were *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (ATCC 11449) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. This latter strain has a broad spectrum of resistance to various commercial germicides, is a non-mucoid strain, is neither invasive nor cytotoxic does not produce pyocyanin (Wang et al., 2014). Stock cultures were maintained at -80°C in glycerol (20% v/v) for both strains. *L. citreum* was routinely cultivated at 30°C in MRS (de Man Rogosa and Sharpe) medium, and *P. aeruginosa* strain was cultivated at 37°C in LB (Luria Bertani) medium.

2.2. Biofilm formation

Biofilms were grown on hydrophilic mixed cellulose ester membranes (with grids) as previously described by (Marchal et al., 2012). Bacteria were grown overnight in MRS or LB broth according to the strain, and further diluted with sterile MRS or LB medium to appropriate cell density monitored by DO600nm measurement. Twenty mL of calibrated suspensions were then filtered through Pall GN-6 Metrical® sterile membranes (diameter 47 mm, pore size 0.45 µm) in order to homogeneously deposit the cells over the membrane surface. The membrane was then cut under sterile conditions in four equal squares of 1.5 cm². Preliminary experiments showed that the cell density on four 1.5 cm² coupons issued from the same membrane was not

statistically different, whether filter deposited cells or biofilm bacteria (data not shown). Each individual coupon was then immediately placed in the centre of a Petri dish (55 mm diameter) containing either MRS solid media with or without sucrose (40 g l^{-1}) for *L. citreum*, and LB solid media for *P. aeruginosa*. This process gave calibrated surface-spread bacteria (SSB) samples which will be used directly for CAP treatments or for biofilm growth. For biofilm growth, plates were incubated during 24 h at 30°C for *L. citreum* or 37°C for *P. aeruginosa*. The *L. citreum* biofilms grown on sucrose-containing medium will be called hereafter “glucan-rich biofilms”. Total mass of biofilms and dry weight measurements were undertaken on 24-h biofilms grown on whole 47 mm membranes, with a moisture analyser (Sartorius MA30) and the wet and dry mass of biofilms were corrected with the mass of the membrane.

2.3. ATR-FTIR spectroscopy

For FTIR analysis, biofilm samples were dehydrated by using a moisture analyser (Sartorius MA30). The coupons were heated at 45°C until reaching constant weight. The spectra of bacterial cells without matrix were obtained by analysing dehydrated pellets of overnight microbial cultures. The extracellular glucan polymer fraction from *L. citreum* NRRL B-1299 was produced by enzymatic reaction from sucrose and purified as previously described by (Bounaix et al., 2009). FTIR spectra were recorded between $4,000$ and 800 cm^{-1} on a Spectrum 65 spectrometer equipped with the Spectrum software (Perkin Elmer). Each spectrum was an average of 32 scans with a resolution of 4 cm^{-1} . For all spectra, baselines were corrected. Spectra were normalized between 1800 and 800 cm^{-1} for the sum of absorbance values equals to 1. Band assignments were made according to the literature (Quilès et al., 2010; Khan et al., 2016). Moreover, in order to compare the different spectra i) overall similarity ($p < 0.05$) between two spectra was directly provided by the data processing software, and ii) a ratio was calculated based on the responses obtained at 1540 cm^{-1} (amide II) and 1070 cm^{-1} (polysaccharides), which will be called hereafter AmII/PS. For this, spectra were normalized on the 1280 cm^{-1} peak which corresponds to a distinctive peak from the membrane, and with low abundance for bacterial cells and biofilm spectra. The amide II band was preferred to the amide I band to represent the protein fraction of the samples due to the absence of response of the membrane at this wavenumber.

2.4. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) analysis was applied on bacterial biofilms which were produced as described previously. Coupons were removed from agar plates and were desiccated under vacuum for 15 min to 1 hour, depending on the samples. No fixation step or staining was performed, as previously proposed by (Lackmann et al., 2013). Samples were then metallized with platinum to allow image acquisition. Analysis was performed with a MEB Quanta 250 FEG FEI at the microscopy platform Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) in Toulouse.

2.5. Plasma source and exposure

The used CAP system was a direct current (DC) corona system as previously described in several studies (Merbahi et al., 2011; Marchal et al., 2012, 2013). The CAP was composed of an anodic tungsten needle (20 μm of radius) inside a cylindrical brass cathode (20 mm of radius) linked to the ground. Plasma jet was supplied by a high-voltage generator through a resistor of 25 mW. The voltage was adjusted at 14.7 kV. The plasma jet was generated directly in the ambient air at atmospheric pressure and launched by itself without any system of gas inlet feed. This corona discharge has a natural repetitive discharge current with a frequency of about 20 kHz. The electric power injected was about 100 mW. The visible plasma effluent was approximately 15-20 mm long and 1-2 mm in diameter.

Preliminary experiments were performed to evaluate the potential bacterial growth inhibition area by the plasma jet. Hence, 100 μL of an overnight *L. citreum* suspension were spread over MRS agar plates, left to dry for 15 min and exposed to a 20 min plasma treatment. The area of bacterial growth inhibition was measured after incubation for 24 h at 30°C.

For treatment of SSB and biofilm samples, plasma was applied directly in the centre of each coupon, and the agar plate was not moved during treatment. The distance between the target sample and the plasma jet was set at 20 mm. Three coupons provided from the same membrane were treated for 5, 10 and 20 minutes, respectively, and the fourth coupon was left untreated (control sample) to estimate the initial bacterial concentration on the membrane.

In order to examine the thermal or dehydration effect of the plasma, temperature was measured on the top of the plasma jet using a thermocouple, and the mass of agar plates before and after 30 min exposure was evaluated in triplicate, respectively.

Optical emission spectroscopy was used to estimate the radiative active species of the plasma effluent column generated by the corona discharge and launched on the *L. citreum* 24 h-biofilm. A spectrophotometer with 0.75 m of focal length (Acton Spectra SP 2750, in the Czerny Turner configuration) covering a spectral range lying between 200 nm and 900 nm was used in this study. The detecting device set at the exit of this spectrophotometer was a CCD camera (PIXIS 100, 1340×100 imaging array of 20 μm× 20 μm pixels). The plasma spectra were collected through an optical fibre (UV-silicon LG-455-020-3) placed at the spectrometer entrance slit (having 50 μm wide) and connected, on the plasma side, to an optical system (composed by 2 magnification lens) aimed to target a small plasma volume. Spectra collections were performed using a 2400 grooves/mm grating in the UV range and a 1800 grooves/mm grating in the visible range. An optical high pass filter was used for the visible range in order to prevent any disruption of the visible spectral range due to the unwanted grating second order of diffraction of the UV light.

2.6. Bacterial viability

Membrane coupons of untreated control and plasma-exposed samples were placed into 1 mL of physiological saline sterile solution and vigorously mixed by vortexing 1 min, which disrupted biofilms and released bacterial cells. Serial ten-fold dilutions were then achieved on the obtained bacterial suspensions, and CFU counts were determined in duplicate on appropriate culture media. The efficacy of this initial recovery step was checked by counting the bacterial cells remaining on the membrane coupon: coupons were once again placed into 1 mL of sterile physiological solution and treated as described above. These experiments showed that more than 95% of cells could be recovered from the coupon by applying the one-step procedure.

Cultivable cell reduction values were calculated by subtracting the log CFU cm⁻² of treated coupons from the log CFU cm⁻² of their own control coupon i.e. provided from the same membrane sample.

2.7. Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate, with independent initial bacterial culture, and results were expressed as mean ± SEM. A one-way ANOVA was conducted and the Newman-Keuls multiple comparison test was used to determine the level of significance against the untreated control value ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Standardization and characterization of the bacterial model biofilms

The aim was at first to obtain biofilms with reproducible bacterial concentrations after 24 h incubation. The methodology applied to produce the biofilms on the membrane led to significantly comparable cell loads with concentrations reaching 8 log CFU cm⁻² for both *L. citreum* and *P. aeruginosa* biofilms (Table 1). It should be mentioned that preliminary experiments based on visual observations showed a partial coverage of the coupon after a 24-h incubation when initial bacterial concentrations were lower than approximately 1.10⁶ CFU cm⁻² for *L. citreum* and 1. 10⁵ CFU cm⁻² for *P. aeruginosa* (data not shown). Although similar cell densities were obtained for the both *L. citreum* biofilms, whether produced with sucrose or not, dry weight, on the other hand, was 4-fold higher for biofilms cultivated on sucrose supplemented medium, demonstrating the production of glucan polymers (Table 1). All the biofilms were well-hydrated with moisture contents of 82% and 92% for *L. citreum* (glucan-rich or not, respectively) and 90% for *P. aeruginosa*. Scanning Electronic Microscopy (SEM) also allowed to visualize the homogeneous distribution of *L. citreum* and *P. aeruginosa* cells on the membrane coupons (Fig. 1). Images showed that all biofilms obtained after 24 h of culture were composed of densely arranged cells, covering the whole surface of the membrane. However, biofilms were physically different: a layer of smooth distinct cells for *L. citreum* biofilm grown on MRS media, cells embedded in a thick slimy matrix due to the overproduction of glucans for *L. citreum* biofilm grown on sucrose supplemented media, and a rough surface for the *P. aeruginosa* biofilm.

ATR-FTIR spectroscopy also showed that the membrane support is well covered by the biofilms (Fig. 2). Indeed, distinctive peaks of the mixed cellulose ester membrane that could be observed at 1280 cm⁻¹ and 840 cm⁻¹ were no longer visible after a 24-hour biofilm development (Fig 2A and 2B). The value of the amide II/polysaccharide (AmII/PS) ratio measured at 1540 cm⁻¹ and 1070 cm⁻¹ peaks (Table 2) revealed that proteins are relatively more present in *P. aeruginosa* cells (average ratio 1.28) than in *L. citreum* cells (average ratio 0.88). The corresponding 24-h biofilms presented a slight increase in protein content compared to the cells alone *P. aeruginosa* biofilm maintained a higher protein content (average ratio 1.39) whereas *L. citreum* biofilm showed a more equilibrated pattern between proteins and polysaccharides (average ratio 1.14). Obviously, a large proportion of polysaccharides, shown as intense peaks ranging from 1200 to 1000 cm⁻¹, was detected on *L. citreum* biofilms grown on sucrose containing

medium, with an AmII/PS ratio of only 0.16. FTIR measurements on purified glucan fractions produced by planktonic *L. citreum* cells grown on sucrose showed a similar spectrum (correlation coefficient of 95%), confirming the abundance of glucans in the ECM.

Table 1. Biofilm characteristics regarding cell density and biomass. Bacterial population was recovered from untreated 24-h biofilms formed on mixed cellulose esters membrane coupon and expressed as log CFU cm⁻². n: replicate number

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>L. citreum</i>	
		without sucrose	with sucrose	
Cell density, log CFU cm ⁻²	8.07 ± 0.46 (n=6)	8.36 ± 0.45 (n=8)	8.8 ± 0.26 (n=8)	
Wet mass, mg	314 ± 21 (n=3)	255 ± 8 (n=2)	466 ± 23 (n=2)	
Dry mass, mg	35.8 ± 5.9 (n=3)	20.3 ± 2.5 (n=2)	82.0 ± 9.9 (n=2)	

Table 2. Intensity of the Amide II / Polysaccharide ratio for planktonic cells and biofilms. Ratio was calculated from ATR-FTIR spectra for wavenumbers 1540 cm⁻¹ (Amide II) and 1070 cm⁻¹ (polysaccharides) after normalisation of the spectra on a distinctive peak of the membrane (1280 cm⁻¹).

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>L. citreum</i>	
		without sucrose	with sucrose	
Cells	1.28		0.88	
24 h biofilm - untreated	1.39 ± 0.03	1.14 ± 0.04	0.16 ± 0.01	
24 h biofilm - treated 20 min	0.95 ± 0.20	0.63 ± 0.20	0.13 ± 0.04	

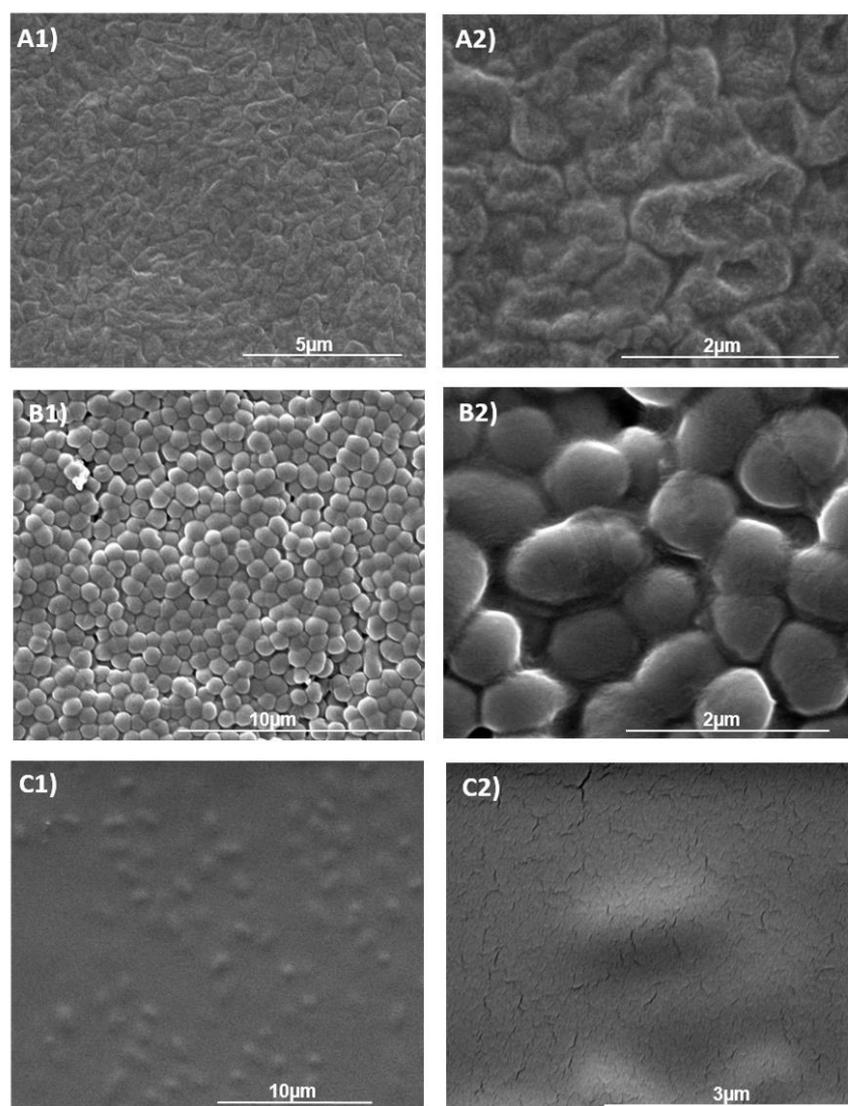


Figure 1. SEM observations of the 24-h biofilms formed on mixed cellulose ester membrane coupon. A) *P. aeruginosa* biofilm on LB medium; B) *L. citreum* biofilm on MRS medium, C) *L. citreum* biofilm on sucrose (40 g l⁻¹) containing MRS. A1, B1, C1 at low magnification and A2, B2, C2 at high magnification.

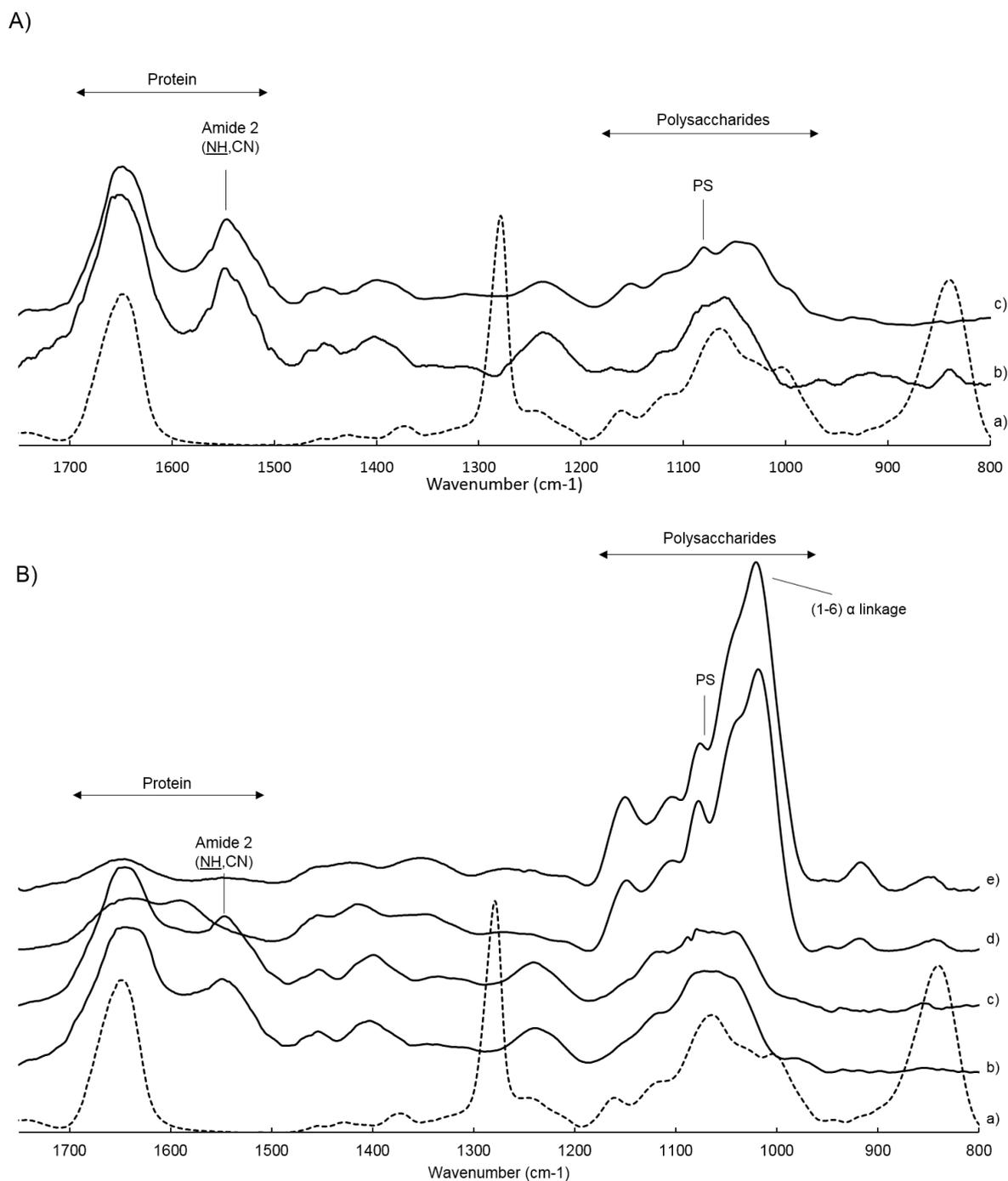


Figure 2. ATR-FTIR spectra of 24-h biofilms compared to planktonic cells and membrane coupon. A) *P. aeruginosa* spectra: a) uninoculated membrane, b) cells of *P. aeruginosa* and c) 24-h biofilm. B) *L. citreum* spectra: a) uninoculated membrane, b) cells, c) 24-h biofilm, d) glucan-rich 24-h biofilm and e) purified glucan polymer. Each spectrum undergoes a baseline correction and for better visibility, each absorbance was express in total absorbance percentage and spectra have been vertically shifted.

3.2. Characteristics of corona plasma jet

Emission spectra were recorded during biofilm treatments (Figure 3). Overall, results revealed the presence of excited molecular species like nitrogen N_2 , molecular ion of nitrogen N_2^+ and free radicals of OH and O on the bacterial biofilm. In particular, emissions of atomic oxygen could be observed at 777 and 844 nm. No emissions were detected at a wavelength below 250 nm, indicating that no UV-C photons had been produced in the plasma effluent. Ozone concentration, which could be produced by the reaction of atomic oxygen with the molecular oxygen of the surrounding environment, was estimated 60-80 ppm nearby the sample (data not shown). The temperature measured at the surface of the biofilm did not exceed 27°C, thereby precluding the heat effect from the plasma. Inactivation of bacteria can be here also excluded from a dehydration effect. Indeed, the loss of water content was estimated less than 3% when mass of agar plates was compared before and after 30 min treatment.

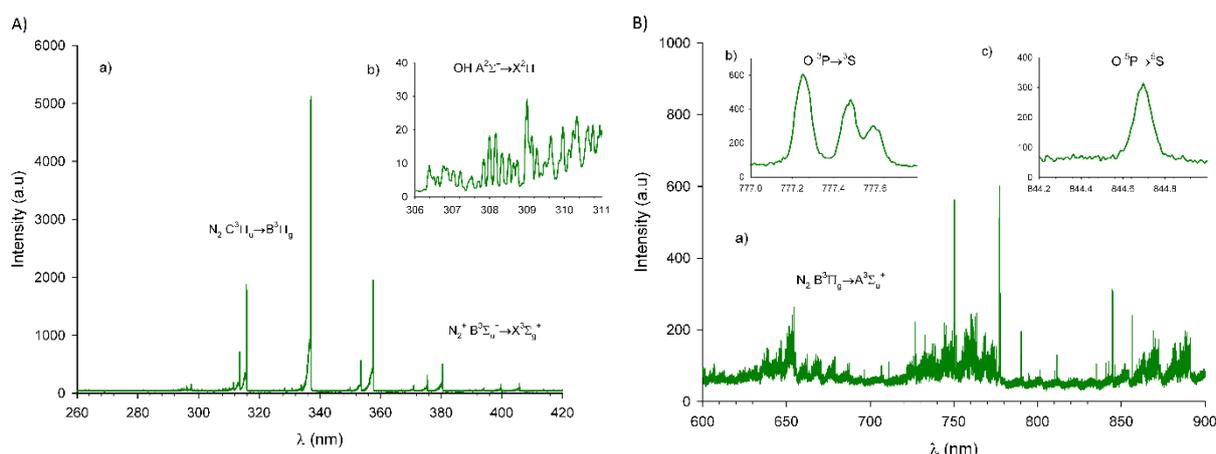


Figure 3. Emission spectra of corona plasma around the needle of the plasma device during *L. citreum* biofilm treatment. A) Emission spectra in the UV range. No emission was detected for wavelength lower than 250 nm. a) Observation of the second positive nitrogen system from 290 nm to 440 nm and the first negative nitrogen system around 392 nm b) OH(A-X) emission from 306 nm to 312 nm recorded with an exposure time 300-fold higher. B) Emission spectra in the visible range. a) Observation of the first positive nitrogen system from 650 nm to 750 nm, b) Emission of atomic oxygen at 777 nm and c) at 844 nm.

3.3. Cold plasma jet treatment of surface-spread cells

Preliminary experiments were conducted with *L. citreum* to determine the surface targeted by the plasma effluent in terms of bacterial growth inhibition area. Even if the diameter of air plasma jet is about 2 mm, the plasma inhibited the growth of bacterial cells over a circular surface of higher diameter (28 ± 1 mm, $n=3$), probably due to the spreading of the active species

generated by the plasma jet into the agar medium. As this inhibition area was really larger than the square coupon surface (15 mm²), it could be suggested that all bacteria deposited or grown on the coupons can be affected by the treatment. For both strains, the eradication efficacy of surface-spread bacteria (SSB) increased with the time of treatment, with a maximal reduction reached after 20 min (Figure 4). For *P. aeruginosa*, a significant 1.8 log bacterial reduction could be observed from a 5-min plasma exposure, to a maximum reduction of 2.3 log after 20 min. A similar response was observed for *L. citreum*: approximately 1.4 log after 5 min of treatment to a maximum of 2.4 log reduction after 20 min. Extended treatment time was investigated up to 40 minutes on both strains and results did not reveal an increase in efficacy (data not shown).

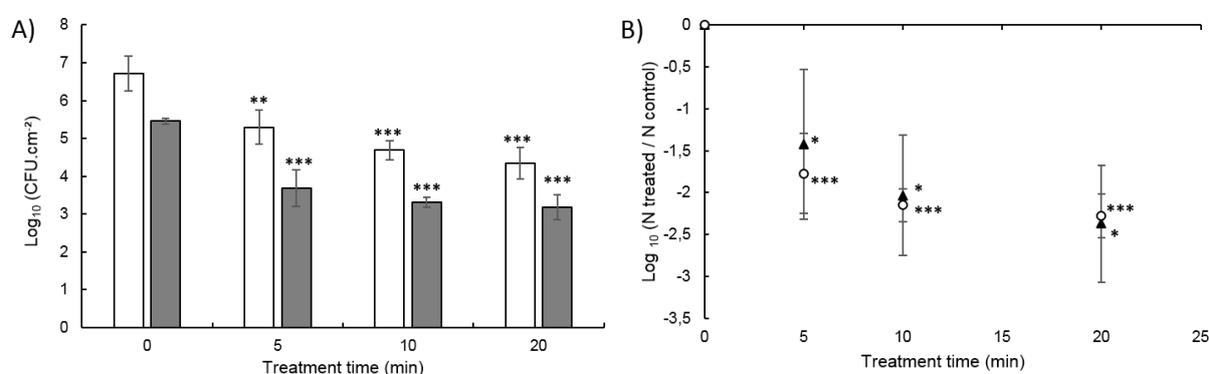


Figure 4. Survival curves for surface-spread bacteria after plasma treatment A) Bacterial population in CFU cm⁻² before and after plasma exposure from 5, 10 and 20 minutes for *P. aeruginosa* (grey bar) and *L. citreum* (open bar); B) Logarithmic reduction of the bacterial population for *P. aeruginosa* (triangle black symbol) and *L. citreum* (circular open symbol). Data represent means \pm sd from 3 independent experiments (*: $p < 0.05$ against the negative control as measured by the Newman–Keuls test)

3.4. Viability of biofilm cells after plasma exposure

When 24-h *P. aeruginosa* biofilms were treated in the same conditions as above, no bactericidal effect could be observed even after 20 min of treatment (Fig. 5). Similar results were obtained when *L. citreum* biofilms were produced in the presence of sucrose, i.e. with high production of extracellular glucan polymers. Conversely, CAP exposure was significantly effective to reduce 24-h *L. citreum* biofilms with similar cell density than the previously described biofilms, by a 1.5 log reduction after 20 min of treatment. SEM images of *L. citreum* and *P. aeruginosa* biofilms after plasma exposure did not reveal noticeable differences in cell size, shape, and surface structure of treated cells versus untreated controls (data not shown). The comparison between normalised ATR-FTIR spectra of *L. citreum* and *P. aeruginosa* biofilms before and after a 20 min

plasma jet treatment (Figure S1) revealed that only *L. citreum* biofilm (without sucrose addition) showed a significantly different profile. However, we could observe that the AmII/PS ratio decreased by approximately 30 to 40% for *P. aeruginosa* and *L. citreum* biofilms, respectively (Table 2), indicating in both cases a relative loss of protein residues.

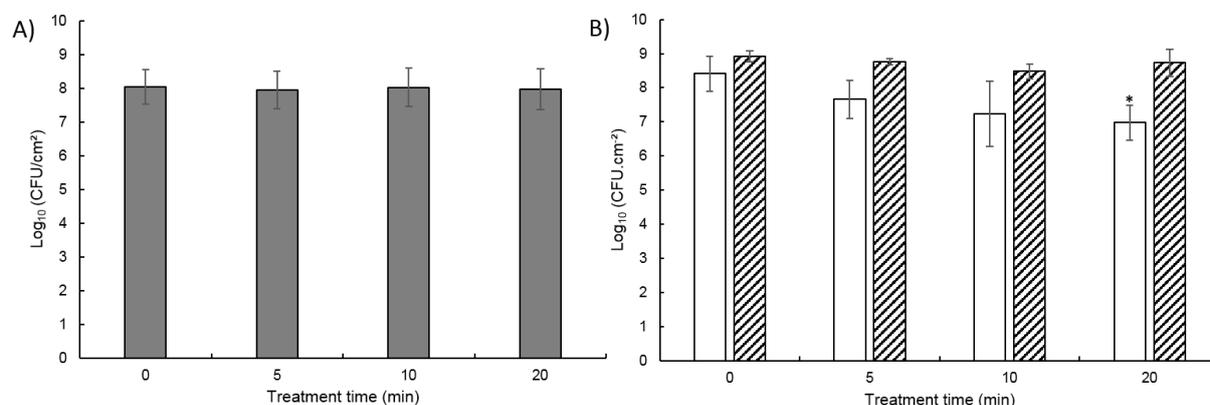


Figure 5. Survival of bacteria in 24-h biofilms after plasma exposure. CFU cm⁻² count on membrane coupon before and after plasma exposure for 5, 10 and 20 minutes (A) *P. aeruginosa* and (B) *L. citreum* grown without (open bar) or with (hatched bar) sucrose. Data represent means \pm sd from 3 independent experiments (*: $p < 0.05$ against the negative control as measured by the Newman–Keuls test)

Discussion

In this study, we first aimed at standardizing biofilm production in terms of cell density to evaluate the efficacy of a CAP treatment between samples with equivalent conditions. Secondly, the work aimed at highlighting the potential implication of the extracellular matrix in the response of biofilms to CAP treatment. In this perspective, *P. aeruginosa* and *L. citreum* strains were selected to target biofilm forming bacteria with different cell wall structures, respectively Gram-negative and Gram-positive, and also because these two bacterial species present contrasted extracellular matrices when growing into biofilms, as described in detail below. To date, there is still no consensus on the plasma resistant property of Gram-positive versus Gram-negative bacteria (Liao et al., 2017), and the ECM is still rarely taken into account as a parameter potentially affecting CAP efficacy.

We first developed reproducible 24-h biofilms, formed on mixed ester cellulose membrane, with a similar cell density of about 8 log cm⁻², before considering eradication treatments. As judged by MEB observations and ATR-FTIR results, the methodology applied in this study clearly provided uniform and homogeneous biofilms covering the whole coupon surface, with similar

cell loads but different extracellular matrices. Deposition of cells obtained by calibrated suspensions through filtration on the membrane coupon, rather than by simple surface deposits, certainly contributed to the formation of a homogeneous biofilm, as previously reported by (Bayliss et al., 2012). Interest in the initial microbial load of biofilm is, to date, rarely considered, especially that bacterial density can vary from 3 to 9 log cm⁻² depending on the study, and sometimes variable even within the same study, with values more often below 6 log (Kamgang et al., 2007; Flynn et al., 2015; Mai-Prochnow et al., 2016; Helgadóttir et al., 2017). In addition, contribution of cell density could be masked when the expression of plasma efficacy is only reported by single logarithmic reduction.

The (untreated) biofilm characterisation by a quantitative approach, using the dry weights of 24-h biofilms, clearly showed the importance of the ECM: dry weight values were 4-fold higher when growing *L. citreum* on sucrose supplemented medium compared to culture on MRS medium alone and *P. aeruginosa* presented an intermediate value, approximately the double of the *L. citreum* biofilm (without sucrose addition) dry weight. In addition, ATR-FTIR spectroscopy was selected for its rapid and broad in situ analysis of the biofilms by providing qualitative information on the nature of the components of the matrix, and also relative quantitative information of some type of compounds (Quilès et al., 2010; Humbert and Quilès, 2011). Despite inherent complexity of ATR-FTIR bacterial spectra, this technique has been successfully employed to monitor the early stages of biofilm formation (Quilès et al., 2010; Humbert and Quilès, 2011) and also once recently employed to investigate biofilm eradication by plasma technology using a submerged dielectric barrier discharge plasma (Khan et al., 2016). In our study, the calculated AmII/PS ratio revealed that the biofilm produced by *P. aeruginosa* ATCC 15442 was rich in proteins. This is consistent with previous reports which showed the presence of abundant proteins, especially amyloids fibrils, along with extracellular DNA and polysaccharides within the biofilm matrix of this strain in a microplate assay (Randrianjatovo et al., 2015; Randrianjatovo-Gbalou et al., 2016), and as usually described for others non-mucoid *P. aeruginosa* strains (Mann and Wozniak, 2012; Wei and Ma, 2013). On the contrary, *L. citreum* biofilms have been poorly studied so far (Badel et al., 2008; Leathers and Bischoff, 2011), however this present study showed that *L. citreum* NRRL B-1299 produced biofilms with a lower relative protein content. Furthermore, the extracellular glucane-saccharases produced by this strain allow to control the production of abundant glucan exopolymers of dextran type (Bounaix et al., 2010; Passerini et al., 2015). This is achieved in a very easy and simple way, since adding

sucrose into the culture medium provides the only substrate required by these extracellular enzymes. It was also shown here that purified glucan polymer fraction from planktonic culture and glucan-rich *L. citreum* 24-h biofilm both presented similar spectra with notably an intense peak at 1020 cm⁻¹, characteristic of α -(1,6) glucosidic linkages which are abundant in dextran polymers (Purama et al., 2009).

Our second concern was to study the implication of the ECM in the biofilm response to CAP treatment. Treatment of surface-spread cells of *P. aeruginosa* and *L. citreum* (without any incubation period) revealed a significant antibacterial time-dependent effect of the CAP treatment. Indeed the cultivability of the bacteria was reduced significantly from 5 min of treatment to a maximal effect reaching less than 1% survival cells after 20 min exposure. These results confirmed previous report on evaluating the effect of a similar plasma device with another LAB strain (Marchal et al., 2012). Unlike some other reports (Flynn et al., 2015; Mai-Prochnow et al., 2016), we did not observe a higher sensitivity of the Gram-negative *P. aeruginosa* strain to plasma exposure, compared to the Gram-positive *L. citreum*. Actually, it is often argued that Gram-negative bacteria are more CAP sensitive due to the inherent thin layer of the peptidoglycan which composes its cell wall (Flynn et al., 2015; Mai-Prochnow et al., 2016). However, other factors such as the overall thickness and the other compounds of the cell envelope can also be taken into account (Han et al., 2015).

When treating 24-h biofilms with an initial load of approximately 8 log bacteria CFU cm⁻², a significant time-dependent cultivability reduction was only observed for *L. citreum* biofilms but without any bactericidal efficacy on *P. aeruginosa* and glucan-rich *L. citreum* biofilms. Accurate direct comparison with the results obtained from the surface-spread condition is rather difficult since the initial microbial load was higher (by a factor 40 to 200) due to the used protocol, which was developed to obtain constant cell density biofilms after 24 h. Therefore, plasma inefficacy within biofilms in respect to SSB could be here attributed to both a higher microbial load and the presence of matrix compounds. However, as initial cell loads for the three biofilms were not significantly different, and also because of their specific biomasses, results obtained in this study thus highlighted the contribution of the ECM in response to CAP treatments. In addition, the data of plasma-induced bacterial reduction for *L. citreum* biofilms grown with or without the addition of sucrose were statistically different, indicating that production of glucans clearly impaired plasma efficacy. Data showed that the cultivability reduction could be

explained quite well ($r^2=0.88$) by taking into account simultaneously the treatment time as well as initial matrix properties (biofilm AmII/PS ratio and total dry weight).

It is generally accepted that the antimicrobial properties of cold plasma are predominantly attributed to the production of reactive oxygen and nitrogen species (RNOS) and in some cases to UV radiations (Mai-Prochnow et al., 2014; Liao et al., 2017; Flynn and Gilmore, 2018). These latter were not present in the plasma jet under the experimental conditions of this study, thus excluding their action. On the other hand, optical emission spectra showed that the plasma jet produced reactive oxygen species (ROS) such as O and OH and reactive nitrogen species (RNS) such as N_2^{-*} and N_2^+ . These reactive species generated during biofilm contact were similar to what has been previously detected when applying this specific plasma device simply in the air (Marchal et al., 2012). Only OH emissions (in the spectral region from 306 to 312 nm) were different, due to the ambient humidity caused by the presence of agar media under the coupon. These species generated in the plasma, might also react with the liquid surrounding the bacteria leading to form antibacterial by-products such as peroxides and superoxides (Lackmann and Bandow, 2014; Gilmore et al., 2018).

The exact mechanisms underlying bactericidal inactivation by cold plasma are still unclear and it is assumed that multiple actions due to the diversity of active agents are playing a role in the permeabilization of cell walls and/or membranes, and in protein damage and enzyme inactivation (Mai-Prochnow et al., 2014; Liao et al., 2017; Flynn and Gilmore, 2018). RNOS are known to exhibit strong oxidative properties, and are able to degrade biomacromolecules, including proteins, lipids, nucleic acids as well as polysaccharides (Duan and Kasper, 2011), present both as cellular and matrix components of biofilms. The role of excited N_2 species is expected to be less significant in the bacteria-inactivation process compared to ROS species (Laroussi, 2009). In agreement with these assumptions, reduced cell viability after CAP treatment revealed to be time-dependant for surface-spread bacteria as well as for biofilms exposing low extracellular compound contents. Moreover, despite the absence of bactericidal effect on biofilms presenting thick matrices, ATR-FTIR measurements revealed a 30% reduction in the amount of protein residues (as evaluated by amide II band) in the *P. aeruginosa* biofilm after 20 min. plasma exposure. This is in agreement with (Khan et al., 2016) who showed that the protein peak region was reduced by 10 to 20 % (also based on AmII/PS ratio) after exposing three different biofilms to a DBD plasma reactor which eradicated 90% of the bacterial

population. In addition, reports on in vitro plasma exposures of purified proteins showed diverse structural alterations (Lackmann and Bandow, 2014; Liao et al., 2017).

One frequent argument to explain why plasma efficacy upon biofilms is reduced, is the presence of the extracellular matrix who acts as a physical barrier to antimicrobials, thereby preventing the penetration of plasma active species (Gilmore et al., 2018). However, ROS species are expected to easily penetrate the biofilms and impact the bacteria deep inside them. For instance, it was reported that ROS generated by plasma were able to penetrate right through to the bottom layer of a 25.5 μm thick *Enterococcus faecalis* biofilm when using a plasma jet, operating in open air (Pei et al., 2012). Components of the matrix can also act as a chemical barrier protecting the cells by possible scavenging of biocidal compounds, as previously mentioned (Alkawareek et al., 2012; Helgadóttir et al., 2017). Accordingly, (Yan et al., 2016) recently reported that extracellular glucan produced by *Leuconostoc mesenteroides* could improve the survival of cells during chronic oxidative stress. Other polysaccharides, such as alginate, a heteropolysaccharide excreted in mucoid *P. aeruginosa* matrix, are also likely to be involved in scavenging hydroxyl radicals (OH) and H_2O_2 (Gambino and Cappitelli, 2016). As evidence, (Gilmore, 2015) reported that the addition of 1.25% alginate to planktonic cells of *P. aeruginosa* PA01 increased the survival from 52% to 91% after a DBD plasma jet exposure. Overall results obtained in this study indicate that the ECM in thick biofilms, such as *P. aeruginosa* and glucan-rich *L. citreum* biofilms has most probably a role in the resistance to plasma treatment. This is also in agreement with a recent study on *Burkholderia cepacia* biofilm sensitivity, which showed that clinical isolates producing the highest amount of biomass were more tolerant to the biocide effect of CAP (Alshraiedeh et al., 2016).

In conclusion, this study allowed to produce similar biofilms in terms of cell densities but different in terms of matrix composition, and thus to evaluate the contribution of the ECM in the response to CAP treatments. Notably, these in vitro 24 h-old mono-species biofilms did not represent complex natural biofilms, but were used as a standardized tools able to produce highly reproducible biofilms for accurate comparative laboratory scale studies. In these conditions, the experiments showed that the characteristics of extracellular matrix in which cells are embedded drastically affect CAP sensitivity. The ECM of biofilms is complex and varies depending on the type of bacteria (species and strain) within the biofilm and on the growth conditions. The ECM should be thus considered, along with the microbial load, when studying

effectiveness of CAP technology. Further studies are now required to better understand the interactions of plasma reactive species within the organic matrix of biofilms.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the University Paul Sabatier and Occitanie Regional Council. Maritxu Labadie was supported by a fellowship from Occitanie Regional Council and IUT 'A' Paul Sabatier. We also thank the "Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB)" in Toulouse for their SEM facilities, David Collado for his help in statistical analyses and Monique Ras-de Moncuit (Blue Science) for proof-reading the manuscript.

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

References

- Alkawareek, M.Y., Algwari, Q.T., Gorman, S.P., Graham, W.G., O'Connell, D., Gilmore, B.F., 2012. Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 381–384.
- Alshraiedeh, N.H., Higginbotham, S., Flynn, P.B., Alkawareek, M.Y., Tunney, M.M., Gorman, S.P., Graham, W.G., Gilmore, B.F., 2016. International Journal of Antimicrobial Agents Eradication and phenotypic tolerance of *Burkholderia cenocepacia* biofilms exposed to atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 446–450.
- Badel, S., Laroche, C., Gardarin, C., Bernardi, T., Michaud, P., 2008. New method showing the influence of matrix components in *Leuconostoc mesenteroides* biofilm formation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 364–370.
- Bayliss, D.L., Walsh, J.L., Iza, F., Shama, G., Holah, J., Kong, M.G., 2012. Complex responses of microorganisms as a community to a flowing atmospheric plasma. *Plasma Process. Polym.* 9, 597–611.
- Bounaix, M.S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., 2009. Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10889–10897.
- Bounaix, M.S., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., 2010. Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 1–9.

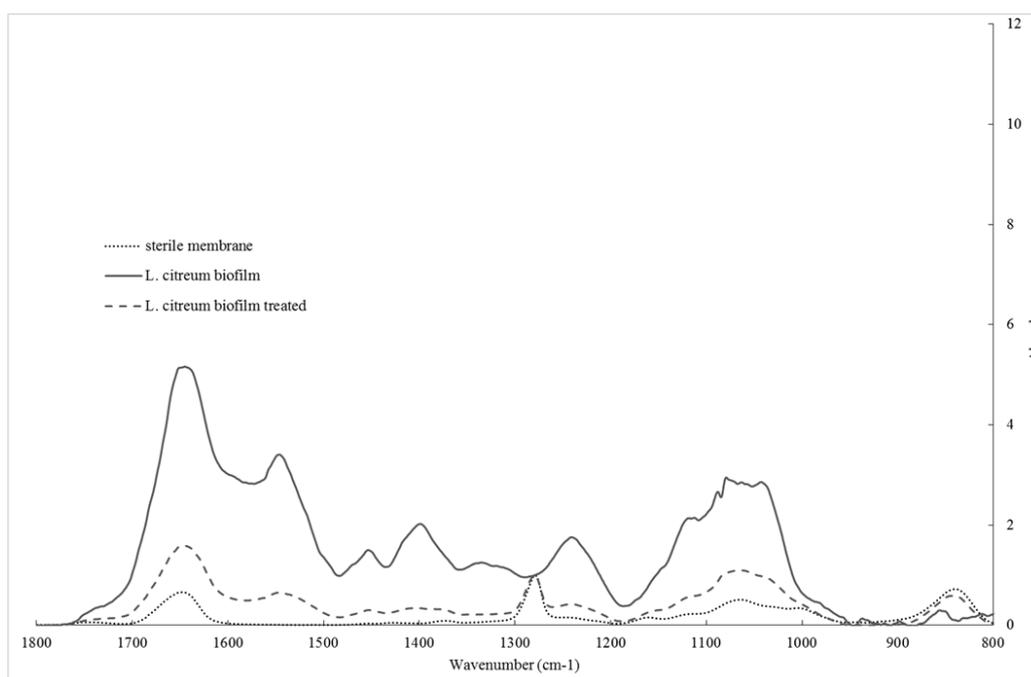
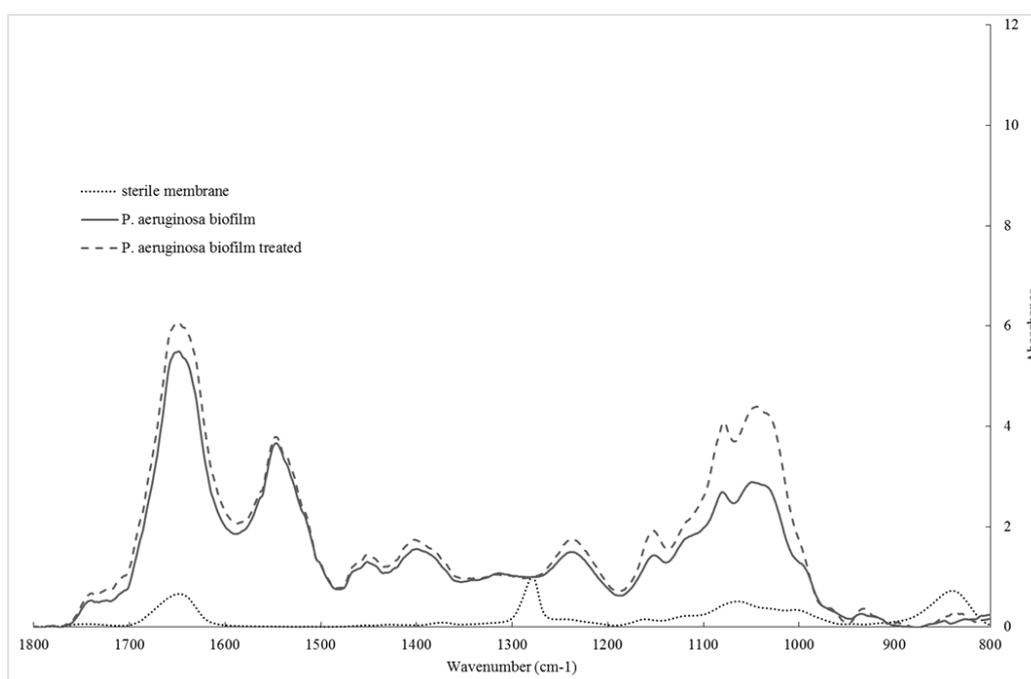
- Bourke, P., Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P.J., Gilmore, B.F., 2017. Microbiological interactions with cold plasma. *J. Appl. Microbiol.* 123, 308–324.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13, 20–26.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F., 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27, 1017–32.
- Duan, J., Kasper, D.L., 2011. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen / nitrogen species 21, 401–409.
- Fernández, A., Shearer, N., Wilson, D.R., Thompson, A., 2012. Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 175–180.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633.
- Flynn, P.B., Gilmore, B.F., 2018. Understanding plasma biofilm interactions for controlling infection and virulence. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 51.
- Flynn, P.B., Higginbotham, S., Alshraideh, N.H., Gorman, S.P., Graham, W.G., Gilmore, B.F., 2015. Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 101–107.
- Gambino, M., Cappitelli, F., 2016. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling* 32, 167–178.
- Gilmore, B.F., 2015. The matrix revisited : understanding the role of extracellular matrix components in biofilm tolerance to atmospheric pressure non-thermal plasma exposure. 22nd Int. Symp. Plasma Chem. 5-10 July 5–7.
- Gilmore, B.F., Flynn, P.B., Brien, S.O., Hickok, N., Freeman, T., Bourke, P., 2018. Cold Plasmas for Biofilm Control: Opportunities and Challenges. *Trends Biotechnol.* 1–12.
- Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljević, V., Cullen, P.J., Bourke, P., 2015. Mechanism of Inactivation by High Voltage Atmospheric Cold Plasma Differs between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Running 1–37.
- Helgadóttir, S., Pandit, S., Mokkalapati, V.R.S.S., Westerlund, F., Apell, P., Mijakovic, I., 2017. Vitamin C Pretreatment Enhances the Antibacterial Effect of Cold Atmospheric Plasma. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 43.
- Humbert, F., Quilès, F., 2011. In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy. *Sci. against Microb. Pathog. Commun. Curr. Res. Technol. Adv.* 2, 889–895.
- Joshi, S.G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U.K., Fridman, G., Friedman, G., Fridman, A., Brooks, A.D., 2011. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1053–62.
- Judée, F., Wattieaux, G., Merbahi, N., Mansour, M., Castani-Cornet, M.P., 2014. The antibacterial activity of a microwave argon plasma jet at atmospheric pressure relies mainly on UV-C radiations. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 47, 405201.

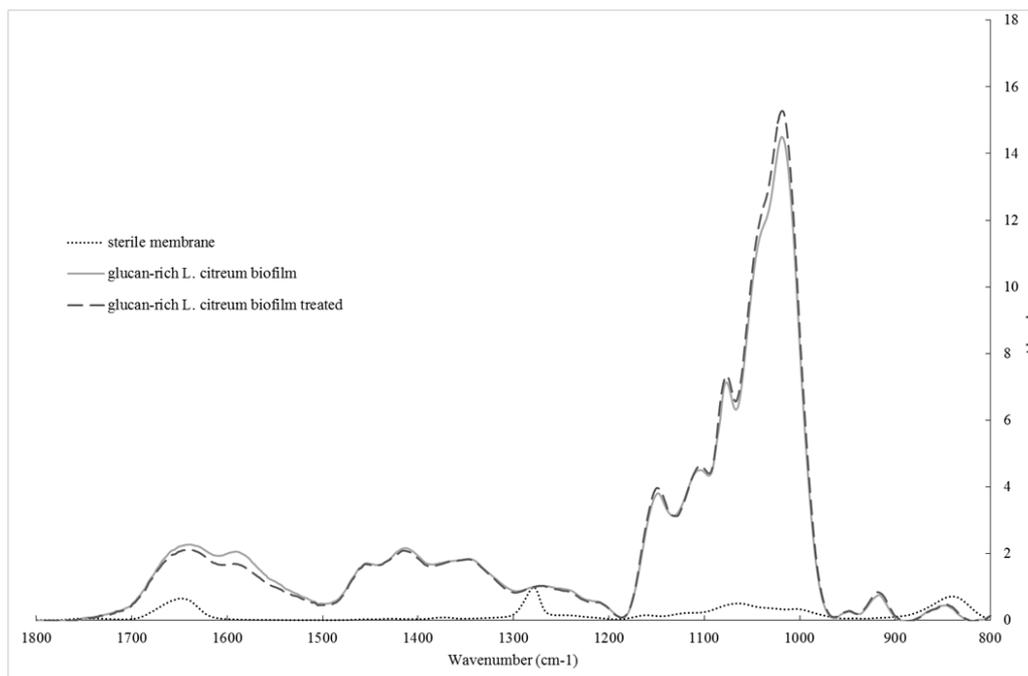
- Kamgang, J.O., Briandet, R., Herry, J.M., Brisset, J.L., Naïtali, M., 2007. Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air. *J. Appl. Microbiol.* 103, 621–628.
- Khan, M.S.I., Lee, E.J., Kim, Y.J., 2016. A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 6, 37072.
- Lackmann, J.-W., Schneider, S., Edengeiser, E., Jarzina, F., Brinckmann, S., Steinborn, E., Havenith, M., Benedikt, J., Bandow, J.E., 2013. Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130591.
- Lackmann, J.W., Bandow, J.E., 2014. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6205–6213.
- Laroussi, M., 2009. Low-Temperature Plasmas for Medicine? *IEEE Trans. Plasma Sci.* 37, 714–725.
- Leathers, T.D., Bischoff, K.M., 2011. Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnol. Lett.* 33, 517–523.
- Liao, X., Liu, D., Xiang, Q., Ahn, J., Chen, S., Ye, X., Ding, T., 2017. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control* 75, 83–91.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., Murphy, A.B., 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci. Rep.* 6, 1–11.
- Mai-Prochnow, A., Murphy, A.B., McLean, K.M., Kong, M.G., Ostrikov, K., 2014. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 508–517.
- Mann, E.E., Wozniak, D.J., 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 893–916.
- Marchal, F., Robert, H., Merbahi, N., Randrianjatovo, I., Martino, P., Yousfi, M., Neuhauser, E., 2013. Atmospheric cold plasmas for biofilm inactivation: does biofilm extracellular matrix limit the bactericidal process? *J. Eng. Technol. Res.* 1, 123–135.
- Marchal, F., Robert, H., Merbahi, N., Yousfi, M., Romain, C.E., Eichwald, O., 2012. Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 45, 345202.
- Merbahi, N., Yousfi, M., Eichwald, O., 2011. Device for emitting a plasma jet from the atmospheric air at ambient temperature and pressure, and use of said device. *Wo* 2011/00170.
- Moreau, M., Orange, N., Feuilleley, M.G.J., 2008. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnol. Adv.* 26, 610–617.
- Pankaj, S., Wan, Z., Keener, K., 2018. Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods* 35, 5–17.

- Passerini, D., Vuillemin, M., Ufarté, L., Morel, S., Loux, V., Fontagné-Faucher, C., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., Moulis, C., 2015. Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 - Identification of three novel α -transglucosylases. *FEBS J.* 282, 2115–2130.
- Pei, X., Lu, X., Liu, J., Liu, D., Yang, Y., Ostrikov, K., Chu, P.K., Pan, Y., 2012. Inactivation of a 25.5 μm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 45, 165205.
- Puligundla, P., Mok, C., 2017. Potential applications of nonthermal plasmas against biofilm-associated microorganisms in vitro. *J. Appl. Microbiol.* 122, 1134–1148.
- Purama, R.K., Goswami, P., Taleb, A., Goyal, A., 2009. Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydr. Polym.* 76, 30–35.
- Quilès, F., Humbert, F., Delille, A., 2010. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 75, 610–616.
- Randrianjatovo-Gbalou, I., Girbal-Neuhauser, E., Marcato-Romain, C.E., 2016. Quantification of biofilm exopolysaccharides using an in situ assay with periodic acid-Schiff reagent. *Anal. Biochem.* 500, 12–14.
- Randrianjatovo, I., Girbal-Neuhauser, E., Marcato-Romain, C.-E., 2015. Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4835–4844.
- Salamitou, S., Kirkpatrick, M.J., Ly, H.M., Leblon, G., Odic, E., Dubow, M.S., 2009. Augmented survival of bacteria within biofilms to exposure to an atmospheric pressure non-thermal plasma source. *Biotechnology* 8, 228–234.
- Wang, Y., Li, C., Gao, C., Ma, C., Xu, P., 2014. Genome Sequence of the Nonpathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Strain ATCC 15442. *Genome Announc.* 2, e00421-14.
- Wei, Q., Ma, L.Z., 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 20983–21005.
- Yan, M., Han, J., Xu, X., Liu, L., Gao, C., Zheng, H., Chen, Y., Tao, Y., Zhou, H., Li, Y., Wu, Z., 2016. Gsy, a novel glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*, mediates the formation of cell aggregates in response to oxidative stress. *Nat. Publ. Gr.* 6, 38122.
- Yousfi, M., Merbahi, N., Pathak, A., Eichwald, O., 2014. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: Toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 28, 123–135.
- Yu, H., Perni, S., Shi, J.J., Wang, D.Z., Kong, M.G., Shama, G., 2006. Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1323–1330.

Supporting information

Figure S1. Comparison of ATR-FTIR spectra from untreated and cold plasma treated 24 h-biofilm samples A) *P. aeruginosa* biofilm, B) *L. citreum* biofilm and C) glucan-rich *L. citreum* biofilm. In each figure, uninoculated membrane (.....), untreated sample (—) and treated for 20 min (— —). Ranging from 1800 to 800 cm^{-1} , ATR-FTIR spectra were normalized on the peak of the membrane at 1280 cm^{-1}





Chapitre III
Évaluation de l'effet biocide d'une LED
UV-C sur des biofilms bactériens
modèles

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, la technologie très récente des diodes électroluminescentes (LED) émettant dans les UV-C semble prometteuse pour remplacer les systèmes classiques de décontamination de surfaces utilisant des lampes à vapeur de mercure à basse pression. Cependant, très peu d'études ont à ce jour été réalisées sur les effets biocides de LED UV-C envers des biofilms bactériens (p.76).

Ainsi, ce chapitre est consacré à **l'étude des effets biocides d'une LED émettant dans les UV-C à 280 nm sur les biofilms bactériens modèles**. De la même façon que pour l'étude du dispositif jet de plasma froid, l'effet antimicrobien a été évalué à la fois sur des cellules déposées en surface (SSB) et des biofilms de 24h des deux souches bactériennes *P. aeruginosa* ATCC 15442 et *L. citreum* NRRL B-1299. Cependant, dans cette partie, afin de mieux discriminer les effets protecteurs de la matrice ou de la densité cellulaire, les expérimentations ont été réalisées en utilisant une gamme de concentrations cellulaires pour les échantillons SSB allant de 5 à 8 log₁₀ pour *P. aeruginosa* et de 7 à 9 log₁₀ pour *L. citreum*. Les biofilms de 24 h ont été testés à la même densité cellulaire que dans le chapitre 1, soit environ 10⁸ CFU.cm⁻².

Les cinétiques d'inactivation après irradiation ont été modélisées en fonction de la dose administrée à l'échantillon. La dose prend en compte le temps de traitement (5, 10 et 20 min), la puissance de la LED (2 mW), la distance entre la LED et l'échantillon (2 cm) et l'angle de diffusion de la lumière (15°). Les doses administrées correspondent ainsi à 660, 1320 et 2640 mJ.cm⁻² pour respectivement 5, 10 et 20 min d'exposition.

Les résultats sont développés dans un article intitulé « *Impact of cell load and extracellular matrix on biofilm tolerance to ultraviolet C light emitting diode* ». pour une soumission prévue dans International Journal of antimicrobial agents.

Principaux résultats :

Pour les bactéries déposées sur membrane (forme SSB), quelle que soit la souche, un effet dose a été observé ; la réduction de la population bactérienne cultivable augmentant avec le temps de traitement (Figure 2). L'effet biocide maximal observé a été similaire pour les deux souches bactériennes, avec une réduction d'environ -2.5 log₁₀ à la dose de 2640 mJ.cm⁻² (temps d'irradiation de 20 min).

Dans le cas de *L. citreum*, nous avons pu observer que l'efficacité du traitement dépend de la densité cellulaire. En effet, la réduction de la population bactérienne est équivalente (environ

2 log₁₀) pour des densités de 10⁷ CFU.cm⁻² et 10⁸ CFU.cm⁻² alors qu'elle n'est plus que d'environ 1 log₁₀ à une densité cellulaire dix fois plus élevée.

Pour une densité cellulaire comparable, la réduction des biofilms de *L. citreum* n'est pas significativement différente (environ 1 log₁₀) de celle de la forme SSB. De plus, aucune différence significative n'a également été observée lorsque les biofilms de *L. citreum* sont produits en milieu supplémenté en saccharose. Ainsi, la présence ou non de glucanes dans la matrice extracellulaire n'influe pas sur l'efficacité du traitement, ce qui démontre que la présence d'une matrice riche en glucanes n'a pas eu d'effet protecteur contre l'irradiation par des UV-C à 280 nm. Il a d'ailleurs été vérifié expérimentalement que la fraction dextrans purifiée de *L. citreum* présente une très faible absorbance dans la zone allant de 250 à 300 nm (Annexe 6).

En ce qui concerne la souche de *P. aeruginosa*, un tel effet de la densité cellulaire mis en évidence précédemment n'a pas été observé sur la gamme de concentration testée : la réduction logarithmique, d'environ 2 log₁₀, n'est pas significativement différente entre les différentes concentrations testées pour la forme SSB (de 10⁵ CFU.cm⁻² à 10⁸ CFU.cm⁻²). En condition de biofilm en revanche et pour une densité de 10⁸ CFU.cm⁻², la réduction n'est plus que de l'ordre de 0,8 log₁₀, démontrant dans ce cas l'effet protecteur de la matrice de *P. aeruginosa* envers l'irradiation par les UV-C (Figure 3).

Enfin, des observations en MEB de biofilms de *P. aeruginosa* avant et après un traitement de 20 min (2640 mJ.cm⁻²) ont permis de mettre en évidence une modification de l'aspect de la surface du biofilm, qui passent d'un aspect initial granuleux à lisse après irradiation (Figure 3).

Discussion

Le dispositif LED UV-C utilisé a bien permis une réduction significative de la population bactérienne, avec un effet variant d'environ 1 à 2,5 log₁₀ suivant les conditions, aussi bien dans le cas de la forme SSB que des biofilms.

Compte tenu de la longueur d'onde d'émission de la LED à 280 nm, l'effet biocide observé peut être vu ici comme la résultante d'une action sur la molécule d'ADN ainsi que sur les protéines. L'action directe des UV-C sur l'ADN par le biais de la formation principalement de dimères de thymine est largement reconnue comme la cause principale de l'inactivation bactérienne. Il a

cependant été montré qu'une irradiation UV-C entraîne de manière indirecte un stress oxydatif (production de radicaux hydroxyles et de peroxyde d'hydrogène) également impliqué dans l'inactivation des cellules bactériennes, et qui peut se traduire par une altération de l'intégrité membranaire (Schenk et al. 2011b; Santos et al. 2013b).

Peu d'études ont encore été réalisées sur l'effet d'un traitement LED UV-C émettant à 280 nm aussi bien sur des cellules planctoniques (Chevremont et al. 2012b; Akgün and Ünlütürk 2017; Kim et al. 2017; Rattanakul and Oguma 2018) que des biofilms (Argyraki et al. 2017; Gora et al. 2019), et aucune n'a pris en compte le facteur de densité cellulaire.

Certains auteurs ont souligné une différence de réponse au traitement par LED UV-C en fonction des propriétés pariétales des souches bactériennes (les bactéries à Gram⁻ étant les plus sensibles) (Chevremont et al. 2012b; Kim et al. 2017); ce qui n'a pas été cependant observé dans notre étude. En effet, au-delà des caractéristiques pariétales, différentes autres caractéristiques peuvent expliquer la variabilité de la réponse au traitement UV-C parmi les souches bactériennes, dont notamment les mécanismes propres de réparation des photo-dommages sur l'ADN (Schenk et al. 2011b; Santos et al. 2013b).

Ici, pour les deux souches étudiées et les formes SSB et biofilms, l'effet biocide maximal a été obtenu pour la plus forte dose appliquée, une relation dose-réponse est ainsi mise en évidence, en accord avec les résultats également décrits dans d'autres travaux (Argyraki et al. 2017; Rattanakul and Oguma 2018). Cette allure bi-phasique de la courbe d'inactivation observée peut ainsi être attribuée au fait d'une destruction rapide des bactéries dans les couches superficielles du biofilm, suivie d'une phase plus lente, en lien soit avec une plus faible diffusion des photons (effet écran), soit avec la présence d'une sous-population résistante. On peut noter que dans le cas des lampes germicides classiques, l'inactivation microbienne est traditionnellement décrite pour les cellules planctoniques par une cinétique de premier ordre, ce qui permet de calculer une constante d'inactivation k (Song et al. 2016), utilisée notamment pour la décontamination d'eau destinée à la consommation.

L'étude de l'effet biocide sur des cellules sous la forme SSB à des densités cellulaires différentes de *L. citreum* a permis de mettre en évidence un impact de la densité cellulaire sur la réponse au traitement. En effet, dans le cas des cellules déposées sur membrane de *L. citreum*, l'effet biocide dépend de la charge bactérienne de l'échantillon à traiter. La comparaison de l'effet

biocide entre les deux types de biofilms de *L. citreum* a par ailleurs montré que la présence ou non de glucanes dans la matrice extracellulaire n'influe pas sur l'efficacité du traitement, démontrant que la présence d'une matrice riche en glucanes qui absorbent peu dans les UV-C n'a pas eu d'effet protecteur contre l'irradiation par des UV-C à 280 nm, malgré sa masse importante.

Inversement, aucun effet de la densité cellulaire n'a pu être mis en évidence pour les cellules déposées de *P. aeruginosa* sur la gamme de concentrations testées ($2,7.10^5$ à $1,9.10^8$ UFC.cm⁻²). En revanche, pour une même charge cellulaire, l'inactivation bactérienne a été significativement réduite après irradiation d'un biofilm par rapport aux SSB. À notre connaissance, ce résultat met en évidence pour la première fois l'influence de la matrice extracellulaire dans la réponse à l'exposition aux LED UV-C pour des biofilms de 24 heures de *P. aeruginosa*.

Ces résultats d'inactivation peuvent sembler faibles (de l'ordre d'un log), mais ils sont en accord avec les valeurs décrites dans les autres études du domaine. Par exemple, le traitement de biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 de densité cellulaire d'environ 10^7 CFU.cm⁻² avec une LED UV-C émettant à 265 nm a conduit à une réduction de l'ordre d'un log (Gora et al. 2019). Il en a été de même pour des biofilms de *P. aeruginosa* de 24h formés sur membrane poreuse et traités par une LED UV-C émettant à 266 nm (Argyragi et al. 2017), avec une réduction de la population bactérienne d'environ 1 log₁₀ pour une dose appliquée évaluée à 2000 mJ.cm⁻², équivalente à notre cas. Dans le cas d'un biofilm de 48h de densité cellulaire équivalente, aucune réduction de la population bactérienne initiale n'a été en revanche observée, suggérant ainsi un rôle protecteur de la matrice. Pour aller plus loin dans la description de l'effet de la matrice, un biofilm de *P. aeruginosa* formé sur un coupon de quartz a été exposé à des UV-C émit par une lampe germicide de sa base vers sa surface (au travers du quartz) ou de sa surface vers sa base (Jones et al. 2016). Il a ainsi été mis en évidence que le traitement UV-C était plus efficace lorsqu'il était appliqué de la base du biofilm vers sa surface, plutôt que de la surface vers la base ; les auteurs ont émis l'hypothèse que l'architecture tridimensionnelle du biofilm, et la localisation dans l'espace des cellules et des composés extracellulaires, pourrait expliquer de telles observations.

Si l'on ne peut exclure que des modifications métaboliques propres au phénotype biofilm soient également impliquées dans cette plus grande résistance des biofilms de *P. aeruginosa* vis-à-vis de l'irradiation UV-C, nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence en grande quantité

d'eDNA et de protéines dans la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* peut être ici responsable de l'absorption d'une partie importante du rayonnement émis par la LED, protégeant ainsi les cellules bactériennes de l'action antimicrobienne. Par ailleurs, nous avons pu observer par microscopie électronique à balayage des modifications de l'aspect de la surface du biofilm de 24 heures de *P. aeruginosa* après un traitement de 20 min. Ceci pourrait résulter de modifications induites par l'irradiation UV-C sur l'ADNe et les protéines extracellulaires de la matrice du biofilm.

Enfin, en lien avec les éléments précédents et l'action des rayonnements UV-C sur les protéines tels que des changements de conformation ou des altérations de différents acides aminés (Santos et al. 2013a) l'analyse des biofilms par spectroscopie infra-rouge avant et après exposition de 20 minutes, données à titre indicatif en résultats complémentaires (p. 210) dans la mesure où les essais n'ont été conduits qu'une fois, a également permis de mettre en lumière une évolution de la composition des biofilms après traitement avec une diminution relative du pic amide II, caractéristique des protéines.

Impact of cell load and extracellular matrix on biofilm tolerance to ultraviolet-C light emitting diode

Maritxu Labadie¹, Frédéric Marchal², Elisabeth Girbal-Neuhauser¹, Catherine Fontagné-Faucher¹ and Claire-Emmanuelle Marcato-Romain^{1*}

1 Université de Toulouse ; UPS, IUT 'A', LBAE EA 4565 (Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale, 24 rue d'Embaquès, F-32000 Auch, France

2 Université de Toulouse ; UPS, INPT, LAPLACE UMR 5223 (Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie), 118 Route de Narbonne, F-31062, France

* Corresponding author

Email address: claire-emmanuelle.romain@iut-tlse3.fr

Phone: +33 5 62 61 63 05

Abstract

In this study, the inactivation of bacterial biofilms by using an ultraviolet-C light-emitting diode (UV-C LED) emitting at 280 nm was investigated, and both the influence of the initial cell surface density and the extracellular matrix on the bacterial response were considered. The experiments were conducted using *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negative) and *Leuconostoc citreum* (Gram-positive). *L. citreum* presented the specificity to produce a large amount of glucan-type exopolysaccharides when growing in the presence of sucrose while the *P. aeruginosa* matrix was naturally rich in extracellular DNA (eDNA) and proteins. UV-C LED irradiation was applied at three doses (660, 1320 and 2640 mJ cm⁻²) on both surface-spread cells and 24-hour grown biofilms with controlled cell loads. Survival bacterial population was determined by standard plate count method.

All surface-spread bacteria and biofilm samples from 10⁵ to 10⁹ CFU cm⁻² showed a dose-dependent response to the irradiation, with a maximal bacterial inactivation of about 2 log₁₀ at the highest UV dose. At a high initial cell load, the treatment efficacy was significantly decreased for *L. citreum* surface-spread cells, while no load effect was highlighted for *P. aeruginosa*. Glucan-rich matrix of *L. citreum* biofilms did not lead to an additional protective effect. On the other hand, for a similar 10⁸ CFU cm⁻² density, *P. aeruginosa* cells were much less sensitive to UV-C when embedded in an extracellular matrix within a biofilm. It was suggested that this protective effect could be attributed to the presence of abundant extracellular DNA and proteins in the matrix of *P. aeruginosa* biofilms.

Keyword

Pseudomonas aeruginosa, *Leuconostoc citreum*, Biofilms, Bacterial survival, Extracellular polymeric substances, UV-C LED

Highlights

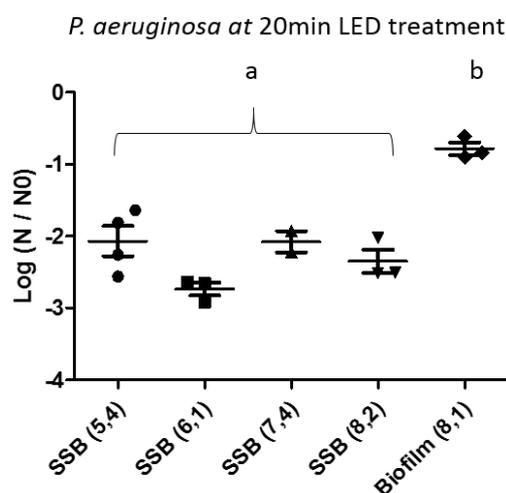
Cell surface density can impact UV-C LED efficacy

First evidence of the matrix protective effect to UV-C LED exposure.

The protein and eDNA-rich matrix of *P. aeruginosa* biofilm prevents cell death due to UV-C

Investigating the matrix effect of irradiation needs standardized biofilms

Graphical abstract



Introduction

Ultraviolet light irradiation is a decontamination technology widely used for water, air and surface disinfection (Hijnen et al., 2006), and also emerging for food preservation (Keklik and Demirci, 2014) or health concerns (Dai et al., 2012). Indeed, a number of advantages is recognized over chemical disinfection like no chemical addition or no harmful by-products production. The germicidal wavelength range is approximately from 200 to 300 nm, and the conventional UV-light for decontamination purposes is generated from mercury lamps which emit at wavelength 254 nm (Chen et al., 2017). UV-C light is well known for its antimicrobial activity due to its properties affecting the DNA of the organism, causing the formation of DNA adducts (cyclobutane-pyrimidine dimers and 6–4 photoproducts) and thus preventing bacterial cell replication and transcription (Ochoa-Velasco et al., 2014; Sinha and Häder, 2002).

As a result of environmental concerns, alternative mercury-free sources are being investigated like semi-conductor UV-C-light emitting diodes (UV-C LED). UV-C LEDs can be configured to emit unique different target wavelengths (Chen et al., 2017) and present other notable advantages over gas-filled lamps: no warm up period, longer life, versatile integration into any design, reduced dimension, low drive voltage requirement, as a non-exhaustive list (Chen et al., 2017). Moreover some reports have shown similar bactericidal efficiency of mercury lamp and UV-C LED on planktonic bacteria (Crook et al., 2015; Sholtes et al., 2016), and works using LEDs as UV source for decontamination are increasing in the recent years (Kim et al., 2017, 2016; Shin et al., 2015; Song et al., 2016). However, cell load has been rarely studied as a factor

influencing LED-UV antibacterial efficacy (Butot et al., 2018), and only scarce works have been yet performed on bacterial biofilms (Argyraki et al., 2017; Jones et al., 2016).

Biofilms are described as cells bound together by extracellular polymeric substances (EPS) and attached to a surface. Composition of the matrix is different according to the bacterial strains but the major components are always polysaccharides, proteins and extracellular DNA (Flemming, 2011). There is abundant evidence indicating that the biofilm mode of life leads to increased bacterial resistance to antimicrobial products when compared to planktonic cells. As example, Bak et al. showed that the UV-C dose required to reach 99% killing of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on permanent catheters was about 100 to 1000 times greater than the lethal dose needed for planktonic cells (Bak et al., 2009). Also studying *P. aeruginosa* biofilms, other authors highlighted the need to investigate the influence of biofilms' parameters such as thickness, opaqueness, maturity, or bacteria species, on the inactivation efficiency of UV-C LED (Argyraki et al., 2017)

Therefore, the main objective of this study was to evaluate the influence of both initial cell load and extracellular matrix composition on the bacterial inactivation efficacy of an UV-C LED emitting at 280 nm against model biofilms of *L. citreum* and *P. aeruginosa*.

Material and methods

2.1 Strains

The two bacterial strains used in this study were *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (ATCC 11449) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®15442TM. Stock cultures were maintained at -80°C in glycerol (20% v/v). *L. citreum* was routinely cultivated at 30°C in MRS (de Man Rogosa and Sharpe) medium, and *P. aeruginosa* strain was cultivated at 37°C in LB (Luria Bertani).

2.2 Bacterial cells deposition on membrane and biofilm formation

Biofilms were formed on mixed cellulose esters membrane coupon as previously described in p. 117. Briefly, bacteria were grown overnight in MRS or LB broth according to strains, and a calibrated suspension was passed through a sterile filtration device containing a membrane Pall GN-6 Metrice[®] (17 cm², pore size 0.45 µm) to achieve an homogeneous deposition of bacteria. Then, the membrane was cut under sterile conditions in four equal coupons of 1.5 cm². Each coupon was deposited on the centre of a Petri dish (55 mm diameter) containing either MRS solid media supplemented or not with sucrose (40 g L⁻¹) for *L. citreum*, and LB solid media for

P. aeruginosa. This allowed to obtain calibrated surface-spread bacteria (SSB) samples which could be used for UV treatment or for subsequent biofilm growth. For biofilm formation, the plates were incubated during 24 h at 30°C or 37°C according to the strain. SSB concentrations were adjusted at different levels by filtering appropriate suspensions i.e. calibrated based on suspensions optical density measurements at 600 nm (OD600). A unique biofilm cell load of about 10^8 CFU cm^{-2} was tested for both strains. All experiments were conducted at least in triplicate by using independently grown cultures. The *L. citreum* biofilms grown on sucrose-containing medium are hereafter called “glucan-rich biofilms”.

2.3 UV-C source and sample exposure

The UV-C treatment was conducted using an Optan UVC-LED (Crystal IS, USA) which emitted at 280 nm (Optan-280K-BL). A static UV LED setup unit was designed with a current regulator, a second LED for visualization of the power-on and a resistor (1 K Ω). The diode was operated in constant current mode of 100 mA. Radiative active species were estimated by optical emission spectroscopy (Acton Spectra SP 2750, in the Czerny Turner configuration). The relationship between tension and intensity was measured with a sourcemeter (Keithley). The spectral power distribution of the LEDs is shown in Figure 1 and revealed a maximum emission at 281 nm and a spectral emission full-width at half-maximum (FWHM) of 13 nm.

The irradiance of the LED (mW cm^{-2}) was determined using the following equation:

$$I = \frac{P}{\pi d^2 \tan^2(\theta)}$$

with P, the optical power of the LED (2 mW); d, the distance between the LED and the sample (2 cm), and θ the viewing angle of the ball lens (15°).

The distance between the LED and the biofilm (square coupon of 1.5 cm^2) was kept constant at 2 cm. As a precaution, a 5 min stabilization phase was applied before bringing out any UV exposure at the centre of the coupon, and the plate was not moved during the treatment. Three coupons issued from the same membrane were treated for 5, 10 and 20 minutes, respectively, and the fourth coupon was left untreated (control sample) to estimate the initial bacterial concentration on the membrane. For each treatment, the applied dose (mJ cm^{-2}) was then obtained by multiplying the irradiance by the treatment duration.

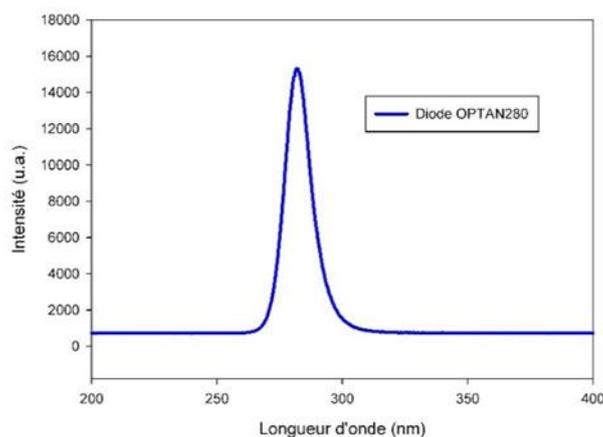


Figure 1: Emission Spectrum of UVC LED OPTAN280

2.4 Colony Forming Units (CFU) counting

Bacterial cultivable population was determined by conventional CFU counting. Control and UV-exposed samples were placed into a microtube containing 1 mL of saline sterile solution (0.9%) and vigorously mixed by vortexing 1 min in order to disrupt SSB or biofilms and release bacterial cells. Serial decimal dilutions were then achieved on the obtained bacterial suspensions, and CFU counts were determined in duplicate on appropriate culture media. Cultivable cells reduction values were calculated by subtracting the \log_{10} CFU cm^{-2} of treated coupons from the \log_{10} CFU cm^{-2} of their own control coupon i.e. issued from the same membrane sample. The biocidal effect was determined immediately after UV exposure, and the levels are therefore independent of DNA repair mechanisms.

2.5 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) analysis was applied on untreated and treated (after a 20-min UV treatment) *P. aeruginosa* biofilms which were produced as described previously. Coupons were removed from agar plates and were desiccated under vacuum for approximately 15 min. No fixation step or staining was performed, as previously proposed by (Lackmann et al., 2013). Samples were then metallized with platinum to allow image acquisition. Analysis was performed with a MEB Quanta 250 FEG FEI at the microscopy platform Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie (CMEAB) in Toulouse.

2.6 Statistical analysis

Both SSB and biofilm samples were assigned to a cell load group, based on the CFU counts of the untreated control coupon. Five groups were hence established for each strain so that: (i) SSB cell loads were significantly different, and (ii) biofilms cell loads were not different from a SSB group. Each group contained at least 3 replicates.

First, the kinetics of inactivation was characterized: the Weibull and a log-linear + tail regressions were used for modelling the microbial survival after treatment using GlnaFiT, a freeware add-in for Microsoft® Excel (Geeraerd et al., 2005). The adequate fitting of the model was confirmed by the coefficient of determination R^2 .

Secondly, the bacterial inactivation rate after a 20-min UV-treatment was calculated within each group as $\log_{10}(N/N_0)$ where N is the irradiated sample count and N_0 the count recovered from the untreated control. One-way ANOVA was conducted and a Newman-Keuls test was then used to determine the level of significance against the negative control values in each experimental series.

Results and discussion

3.1 Effect of LED treatment on survival of surface-spread bacteria

Surface-spread cells of *L. citreum* and *P. aeruginosa* were exposed to three doses (660, 1320 and 2640 mJ cm^{-2}). UV-C LED irradiation was effective for both strains, for all cell densities and all doses, to reduce SSB with significant differences versus untreated controls in most cases (Figure 2). However, maximal viability reduction determined by viable counts was about 1 to 2 $\log_{10}(\text{CFU cm}^{-2})$, whatever the strain. These results are relevant with those presented by Butot et al. who studied the inactivation of spread cells on berries surfaces at comparable doses (Butot et al., 2018).

In any cases, bacterial survival showed a dose-response; the maximal reduction was always obtained at the maximal UV-C dose. Microbial inactivation by UV-C treatments has traditionally been described by first-order kinetics, allowing to calculate an inactivation constant k (Song et al., 2016). However, some authors recently reported a two-phase response when adhered bacteria or biofilms were exposed to UV-C, leading to a maximal inactivation that could not be overpassed even when extending the duration of the treatment (Argyraki et al., 2017; Butot et al., 2018; Gabriel et al., 2018). In the literature, different potential causes of a tailing effect have been mentioned among which presence of resistant sub-populations (Gora 2019), cell

aggregation (Schenk et al., 2011) or substratum properties (Butot et al., 2018). Studying adhered bacteria of *Salmonella enterica*, (Gabriel et al., 2018) showed that the inactivation kinetics presented a biphasic behavior as well as did the UV-C treatment of *P. aeruginosa* biofilms (Argyaki et al., 2017). In the present study, due to a limited number of experimental values, such a model could not be used, but the Weibull model indicated a good fit to the *L. citreum* data while the log-linear + tail model fitted well for *P. aeruginosa* data ($R^2 \geq 0.9$), as it did in the work of (Argyaki et al., 2017).

The influence of the initial cell load on the inactivation by UV-C was then investigated. *L. citreum* cells were spread on membrane at three different loads ($4.8 \pm 2.0 \cdot 10^6$ CFU cm⁻²; $5.8 \pm 0.2 \cdot 10^7$ CFU cm⁻²; $6.8 \pm 0.8 \cdot 10^8$ CFU cm⁻²). The maximal bacterial inactivation was similar for the two lower cell densities (-1.9 ± 0.5 and $-2.2 \pm 0.1 \log_{10}$) but was significantly reduced at the higher cell load ($-1.1 \pm 0.4 \log_{10}$). Moreover, in the latter case, the effect was not significantly different from the control after a 5-min exposure. These results highlighted the impact of the cell surface density in the response to UV-C LED treatment and can suggest a threshold effect. On the other hand, such an effect was not observed for *P. aeruginosa* surface-spread cells; the bacterial inactivation was approximately of 2 log₁₀ whatever the initial load from $2.7 \pm 1.3 \cdot 10^5$ and $1.9 \pm 1.3 \cdot 10^8$ CFU cm⁻². However, the maximal tested cell load for *P. aeruginosa* was lower than for *L. citreum*, and for non-significantly different cell densities ($1.9 \pm 1.3 \cdot 10^8$ and $5.8 \pm 2.3 \cdot 10^7$ CFU cm⁻² respectively). This results are in opposition with (Abshire 1981) who showed in *P. aeruginosa* planktonic bacteria at high cell density (10^8 CFU mL⁻¹) a reduction of UV-C biocidal effect (reduction of 4 log₁₀) compared to two lower density, 10^6 CFU mL⁻¹ and 10^7 CFU mL⁻¹ (with a reduction of 5 log₁₀). This divergence seems due to the UV-C penetration on SSB.

Furthermore, the bacterial reduction was comparable between the strains (-2.4 ± 0.3 and $-2.2 \pm 0.1 \log_{10}$). While, some authors showed a different cell load response to UV-C treatment between Gram+ and Gram- bacteria (Butot et al., 2018; Ana L. Santos et al., 2013); however the present results do not allow to corroborate these previous observations. Indeed, beyond the Gram properties, various hypothesis can be formulated to explain the variability of the response to UV-C treatment among bacterial strains (Gwynne and Gallagher, 2018; Ana L Santos et al., 2013; Schenk et al., 2011): ((i) UV-C can damage other biomolecules than DNA, like lipids or proteins by oxidative mechanisms so that each strain would present a specific response depending on the composition of the bacterial envelopes; (ii) each strain presents its

own biological responses, like DNA repair mechanisms and anti-oxidative responses, to fight against environmental stresses. Moreover, UV-C irradiation does not penetrate through the whole depth of cell clumps, multiple cell layers or of thick biofilms (Argyaki et al., 2017; Gwynne and Gallagher, 2018); such a physical phenomenon might explain the reduction of UV-C treatment efficacy in the case of high bacterial cell loads observed in this study.

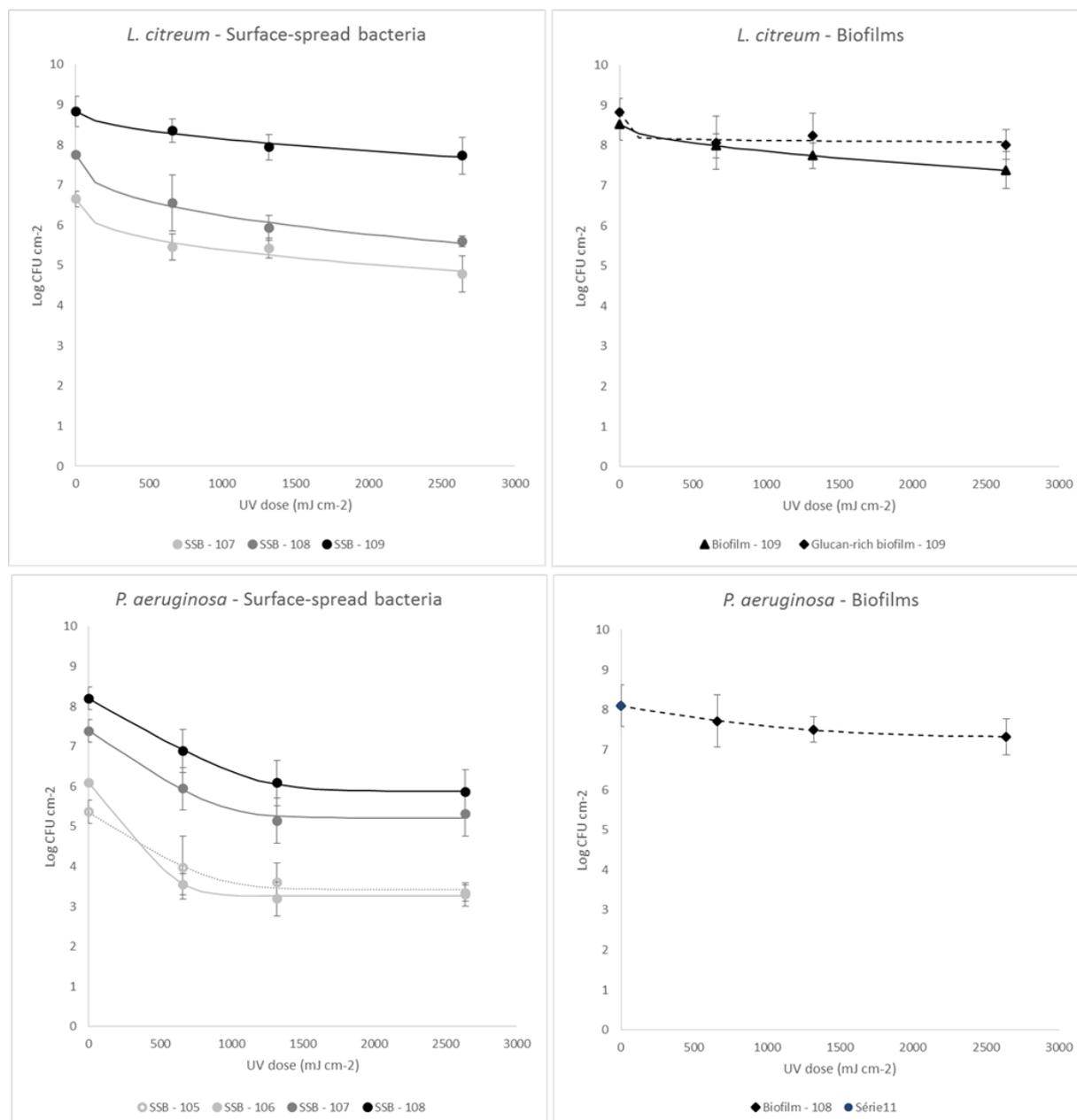


Figure 2: Survival curves after LED UV-C treatment of surface-spread bacteria and 24-h biofilms: (A) *Leuconostoc citreum* experimental (Weibull fit); (B) *Pseudomonas aeruginosa* (Log linear + tail fit). The results are means of at least 3 independent replicates with error bars indicating standard deviation.

2.2 Effect of UV-C LED exposure on *L. citreum* and *P. aeruginosa* biofilms

The survival curves of *L. citreum* and *P. aeruginosa* biofilms, expressed in CFU cm⁻², as a function of UV dose (mJ cm⁻²) are shown in figure 2. As in the case of surface-spread cells, a dose-response effect was observed for both strains, with a maximal inactivation after 20 minutes of exposure i.e. 2640 mJ cm⁻². However, the reduction values were reduced in comparison to the SSB ones, being lower than -1.2 log₁₀ at the maximal UV-C dose, whatever the biofilm. The lowest inactivation value (-0.8 ± 0.2 log₁₀) was obtained for *P. aeruginosa* biofilms, and both the models were adapted to describe the kinetics of inactivation (R²~1). The Weibull model fitted well with *L. citreum* biofilm kinetics to describe the kinetics (R²=1.0) but not with the glucan-rich biofilms values (R² ≤ 0.8)

The inactivation values obtained for *L. citreum* biofilms did not allow to highlight a potential influence of the matrix in the response to UV-C irradiation. Indeed, the viability reduction of about 1 log₁₀ at the maximal dose was not significantly different between SSB and biofilms (with or without a glucan-rich matrix) presenting the same initial cell load (Figure 3). In addition, the presence of glucans in the biofilm matrix, induced by sucrose adjunction in the culture medium, did not lead to a greater cell protection in comparison to a low-glucan matrix for biofilms at non-significantly different cell densities of about 5.10⁸ UFC cm⁻². Indeed, it was checked that the purified glucan fraction from *L. citreum* NRRL B-1299 had very low absorption around 280 nm (data not shown).

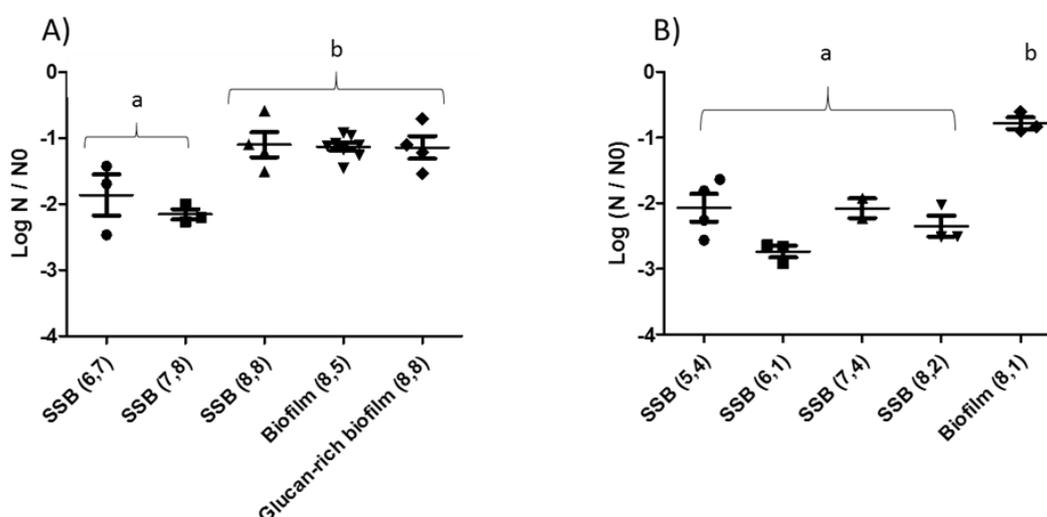


Figure 3: Effect of cell load and extracellular matrix on bacterial inactivation ($\log_{10}(N/NO)$) at 2640 mJ cm⁻². A) *Leuconostoc citreum* B) *Pseudomonas aeruginosa*. Initial cell concentration ($\log_{10} NO$) of each group is given in parenthesis in the x-axis. Mean values with different letters are significantly different ($p < 0.05$) as measured by the Newman-Keuls test.

On the other hand, the results obtained from *P. aeruginosa* biofilms were more informative. For a given cell load, the bacterial inactivation was significantly lowered after irradiation of a biofilm, in comparison to SSB (Figure 3). To our knowledge, this result points out for the first time the influence of the extracellular matrix in the response to LED UV-C exposure for *P. aeruginosa* 24-hour biofilms. However, a similar effect was recently addressed by (Jones et al., 2016) who exposed 4-day biofilms of *P. aeruginosa* to conventional outside-in (from the surface of the biofilm) or to an inside-out (through an UV-transparent material substratum) irradiation. These authors showed that the UV-treatment applied inside-out was more effective than applied outside-in, and they hypothesized that the 3D architecture (an internal cellular region shielded by an outer polymeric matrix) could explain such observations. As the above results suggested that matrix compounds could absorb and/or scatter UV photons and, as a consequence, be responsible of the reduced bacterial inactivation observed, we further investigated the nature of *P. aeruginosa* extracellular matrix by CLSM (Figure 4). However, it is well known that extracellular DNA (eDNA) is an important polymer of the matrix of *P. aeruginosa* biofilms (Okshevsky and Meyer, 2013). Furthermore, a previous study, realized on the same strain, shown that 24-h biofilm naturally contains eDNA and protein in the matrix (Randrianjatovo 2015). DNA is the main cellular target of UV-C, and, as example (Ana L Santos et al., 2013) had shown that DNA strand breakage was a good predictor of planktonic cells inactivation. Consequently, eDNA might have interacted with the UV radiations and might have absorbed a substantial part of the energy delivered by the LED, thus protecting bacterial cells from inactivation. Moreover, as expected, proteins were also abundantly labelled in this biofilm and can have contributed to the matrix protective effect. As a matter of fact, proteins can also be a target for UV radiations that induce, for example, some conformational or compositional changes (Ana L Santos et al., 2013).

To understand the biocidal effect of UV-C LED, we further investigated the topography of *P. aeruginosa* extracellular matrix by SEM, before and after the maximal treatment (2640 mJ cm^{-2}) (Figure 4). The irradiation seems to have an effect on the surface of the biofilm which goes from an initial granular appearance to a smoother and gelatinous state after treatment. We can hypothesis a modification of the biochemical composition of the matrix (protein and eDNA fraction)

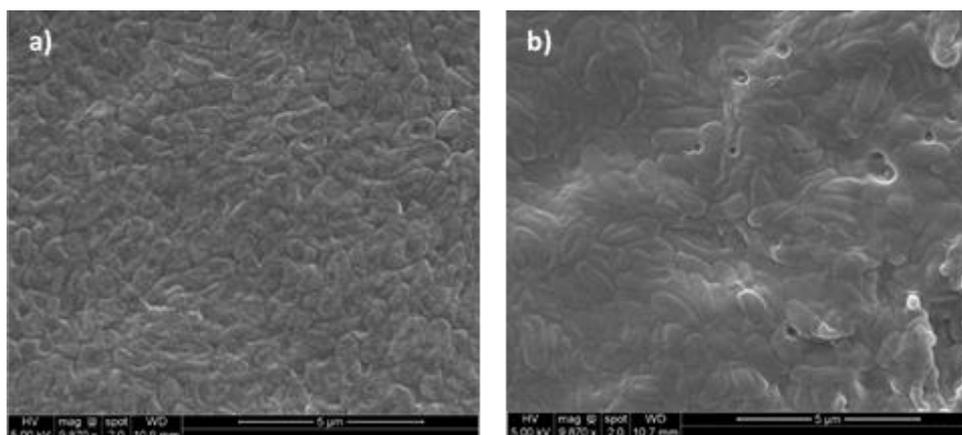


Figure 4: SEM observations of the biofilm of *P. aeruginosa* formed on mixed cellulose ester membrane coupon, a) untreated biofilm; b) treated biofilm after 2640 mJ cm⁻²

Conclusion

In the present study, a UV-C LED irradiation was applied on surface-spread cells and biofilms of *L. citreum* and *P. aeruginosa* under standardized conditions in order to control and compare initial cell surface density and extracellular matrix impacts. The results clearly showed that this innovative technology can effectively inactivate bacterial strains. They also revealed a dose-response in all cases, the inactivation being the highest for the highest UV-C dose. For *L. citreum*, a cell-load response was also highlighted, and no protective effect of a glucan-rich matrix was observed. For *P. aeruginosa*, UV irradiation of surface-spread bacteria did not reveal any effect of the initial load (from 10⁵ to 10⁹ UFC cm⁻²), but cell inactivation was strongly reduced by the presence of extracellular polymeric substances, and particularly eDNA and proteins. Further studies are required to better deal with such biofilms, focusing for example on: (i) characterizing in more detail both matrix and cell composition and (ii) improving the adequacy between LED and biofilms properties (wavelength, inside-out exposure).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant (number 14055695) from the Occitanie Regional Council and funding from Toulouse University, France. We also thank the “Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB)” in Toulouse for their SEM facilities. The authors also thank Monique Ras for proof-reading the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Argyraki, A., Markvart, M., Bjørndal, L., Bjarnsholt, T., Petersen, P.M., 2017. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after ultraviolet light-emitting diode treatment: a comparative study between ultraviolet C and ultraviolet B. *J. Biomed. Opt.* 22, 065004.
- Bak, J., Ladefoged, S.D., Tvede, M., Begovic, T., Gregersen, A., 2009. Dose requirements for UVC disinfection of catheter biofilms. *Biofouling* 25, 289–296.
- Butot, S., Cantergiani, F., Moser, M., Jean, J., Lima, A., Michot, L., Putallaz, T., Stroheker, T., Zuber, S., 2018. UV-C inactivation of foodborne bacterial and viral pathogens and surrogates on fresh and frozen berries. *Int. J. Food Microbiol.* 275, 8–16.
- Chen, J., Loeb, S., Kim, J.H., 2017. LED revolution: Fundamentals and prospects for UV disinfection applications. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 3, 188–202.
- Crook, M.J., Jefferson, B., Autin, O., MacAdam, J., Nocker, A., 2015. Comparison of ultraviolet light emitting diodes with traditional UV for greywater disinfection. *J. Water Reuse Desalin.* 5, 17.
- Dai, T., Vrahas, M.S., Murray, C.K., Hamblin, M.R., 2012. Ultraviolet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 185–95.
- Flemming, H.-C., 2011. The perfect slime. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 86, 251–9.
- Gabriel, A.A., Ballesteros, M.L.P., Rosario, L.M.D., Tumlos, R.B., Ramos, H.J., 2018. Elimination of *Salmonella enterica* on common stainless steel food contact surfaces using UV-C and atmospheric pressure plasma jet. *Food Control* 86, 90–100.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 95–105.
- Gwynne, P.J., Gallagher, M.P., 2018. Light as a Broad-Spectrum Antimicrobial. *Front. Microbiol.* 9, 119.
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Res.* 40, 3–22.
- Jones, C.C., Valdeig, S., Sova, R.M., Weiss, C.R., 2016. Inside-out Ultraviolet-C Sterilization of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm In Vitro. *Photochem. Photobiol.* 92, 835–841.

Keklik, N.M., Demirci, A., 2014. Applications and Modeling Aspects of UV and Pulsed UV-Light for Food Decontamination. In: Boziaris, I.S. (Ed.), *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*. CRC Press, pp. 67–101.

Kim, D.K., Kim, S.J., Kang, D.H., 2017. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Res. Int.* 97, 280–287.

Kim, S.J., Kim, D.K., Kang, D.H., 2016. Using UVC light-emitting diodes at wavelengths of 266 to 279 nanometers to inactivate foodborne pathogens and pasteurize sliced cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 11–17.

Ochoa-Velasco, C.E., Cruz-González, M., Guerrero-Beltrán, J.Á., 2014. Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in coconut (*Cocos nucifera* L.) milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 26, 199–204.

Okshevsky, M., Meyer, R.L., 2013. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 7828, 1–11.

Randrianjatovo-Gbalou, I., Rouquette, P., Lefebvre, D., Girbal-Neuhauser, E., Marcato-Romain, C.-E., 2017. In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *J. Appl. Microbiol.* 122, 1262–1274.

Randrianjatovo, I., Girbal-Neuhauser, E., Marcato-Romain, C.-E., 2015. Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4835–4844.

Santos, A.L., Moreirinha, C., Lopes, D., Esteves, A.C., Henriques, I., Almeida, A., Rosa, M., Domingues, M., Delgadillo, I., 2013. Effects of UV Radiation on the Lipids and Proteins of Bacteria Studied by Mid-Infrared Spectroscopy.

Santos, A.L., Oliveira, V., Baptista, I., Henriques, I., Gomes, N.C.M., Almeida, A., Correia, A., Cunha, Â., 2013. Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch. Microbiol.* 195, 63–74.

Schenk, M., Raffellini, S., Guerrero, S., Blanco, G.A., Maris, S., 2011. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light : Study of cell injury by flow cytometry. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 191–198.

Shin, J.-Y., Kim, S.-J., Kim, D.-K., Kang, D.-H., 2015. Fundamental Characteristics of Deep-UV Light-Emitting Diodes and Their Application To Control Foodborne Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2–10.

Sholtes, K.A., Lowe, K., Walters, G.W., Sobsey, M.D., Linden, K.G., Casanova, L.M., 2016. Comparison of ultraviolet light-emitting diodes and low-pressure mercury-arc lamps for disinfection of water. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 37, 2183–2188.

Sinha, R.P., Häder, D.-P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 225–236.

Song, K., Mohseni, M., Taghipour, F., 2016. Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review. *Water Res.* 94, 341–349.

Résultats complémentaires

Une analyse complémentaire par spectroscopie infrarouge (ATR-FTIR) a été réalisée pour étudier les effets de la LED UV-C à 280 nm sur les biofilms. Les résultats ci-dessous sont donnés à titre indicatif dans la mesure où ces expérimentations n'ont pu être réalisées qu'une seule fois.

Les spectres ATR-FTIR des biofilms de *P. aeruginosa* et de *L. citreum* après 20 minutes d'irradiation ont été acquis selon le protocole décrit p. 119 (Figure 73). L'acquisition des spectres a été réalisée au centre du coupon, au point situé à la verticale de la LED pendant l'exposition. De façon équivalente aux expérimentations menées dans le cas du traitement par plasma froid (chapitre II), les spectres obtenus ont été normalisés à 1280 cm^{-1} et comparés à ceux obtenus pour la membrane seule, la fraction de dextrane purifiée à partir d'une culture planctonique produit par *L. citreum* en présence de saccharose, les cellules des deux souches (culot des cultures planctoniques) et les trois biofilms avant traitement. L'analyse des spectres a été réalisée via l'évaluation du rapport des pics Amide II (1540 cm^{-1}) et polysaccharides (1070 cm^{-1}), nommé AmII/PS (voir p.122) sur les spectres normalisés.

L'effet du traitement à la LED UV-C sur les biofilms a été analysé par comparaison des ratios AmII/PS entre les échantillons témoins et traités, comme dans le cas du traitement au jet de plasma froid (voir p.165).

Tableau 12 : Rapport des pics AmII/PS ($1540\text{ cm}^{-1} / 1070\text{ cm}^{-1}$) pour les biofilms avant et après traitement de 20 minutes avec la LED UV-C

Modalité	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. citreum</i>	
		Sans saccharose	Avec saccharose
Témoin	$1,39 \pm 0,03$	$1,14 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,01$
Traité	1,05	0,78	0,12

L'observation des rapports AmII/PS révèle une diminution des valeurs l'ordre de 37%, 32% et 25% respectivement pour les biofilms de *P. aeruginosa* et *L. citreum* sans ou avec saccharose. Cette diminution traduit une modification de la composante protéique de ces biofilms, ce qui est en accord avec les travaux de Santos et collaborateurs, qui ont montré par une analyse en spectroscopie IR que les UV-C entraînent des modifications structurales des protéines (Santos

et al. 2013a). Même si comme précisé précédemment, ces analyses demandent à être renouvelées pour valider les résultats obtenus, les modifications structurales de la matrice des biofilms mises en évidence notamment au niveau de la fraction protéique semblent jouer un rôle dans la réponse des biofilms au traitement par la LED UV-C.

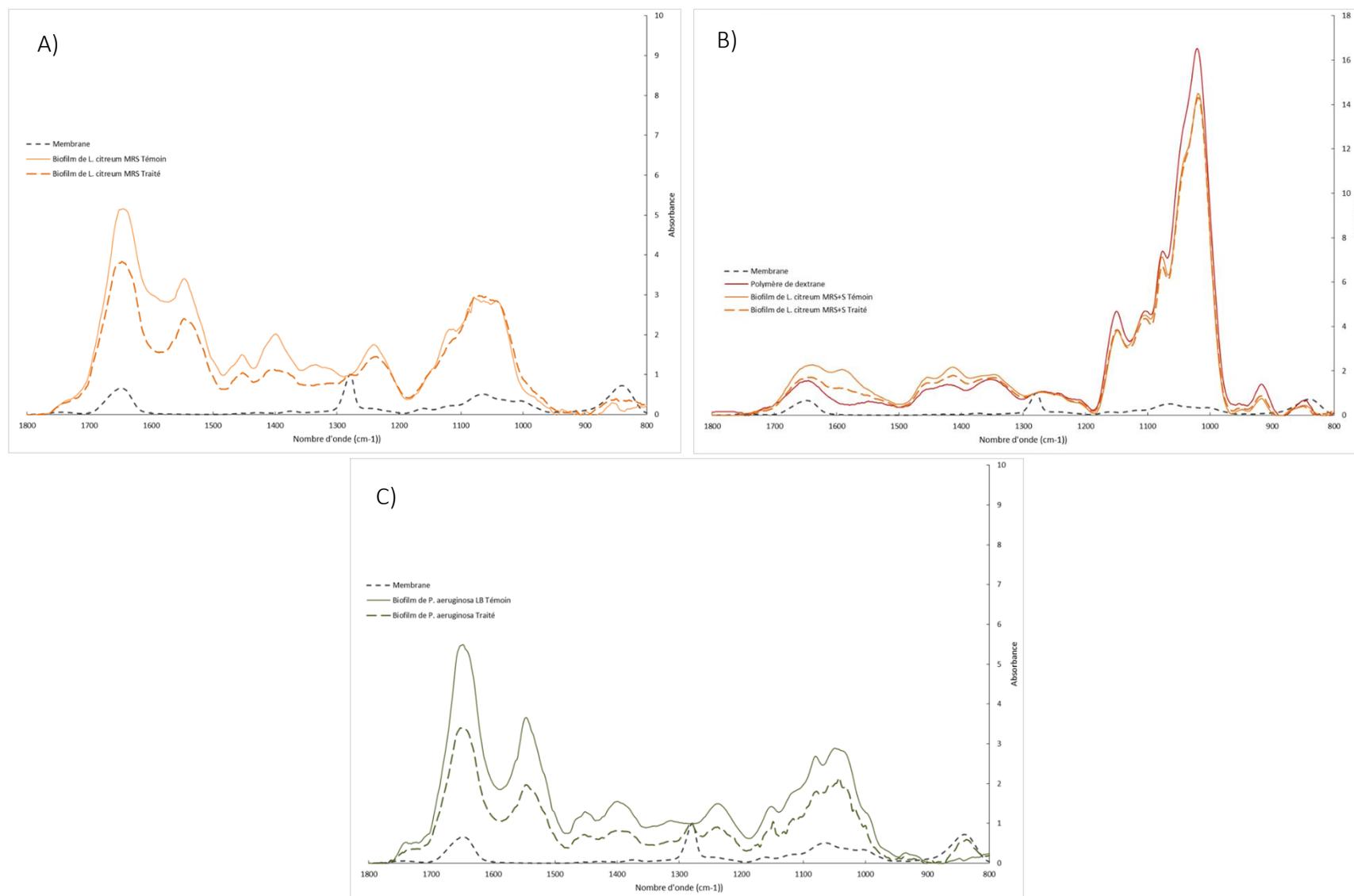


Figure 73 : Spectres IR des biofilms témoins et traités à la LED UV-C ; A) *L. citreum* en milieu MRS, B) *L. citreum* en milieu MRS + saccharose, C) *P. aeruginosa* sur milieu LB

Chapitre IV
Développement de méthodes d'analyse
de la viabilité cellulaire

Ce chapitre est consacré au développement d'une méthode permettant d'étudier la viabilité cellulaire au sein de biofilms avant et après traitement par jet de plasma froid ou LED UV-C. En effet, dans les chapitres précédents consacrés à l'étude de l'activité antimicrobienne de ces dispositifs, seule la cultivabilité a été exploitée pour déterminer l'efficacité biocide du jet de plasma ou de la LED UV-C 280 nm. Or, l'étude bibliographique a permis de constater que la viabilité n'est pas synonyme de cultivabilité (Nocker and Camper 2009; Emerson et al. 2017). Par ailleurs, pour chacun des deux types de traitements, quelques auteurs ont suggéré la présence de population bactérienne dans un état viable non cultivable (VNBC) dans le cas de traitement par des UV-C (Zhang et al. 2015) ou par plasmas froids (Brelles-Mariño 2012; Dolezalova and Lukes 2015). C'est pourquoi, dans cette partie, deux méthodes vont être développées pour avoir accès à la viabilité cellulaire: une méthode basée sur l'intégrité membranaire, la **PCR de viabilité notée v-qPCR** (ou PMA/EMA qPCR), et une méthode basée sur l'activité métabolique, l'essai à la **résazurine**.

Le principe de la viabilité qPCR (v-qPCR) ou PMA/EMA-qPCR repose sur l'inhibition de l'amplification de l'ADN génomique des cellules dont l'intégrité membranaire est compromise. Pour cela, avant extraction et amplification de l'ADN, les suspensions bactériennes sont préalablement traitées par un agent intercalant, l'EMA ou le PMA, qui pénètre uniquement à l'intérieur des cellules dont la membrane cytoplasmique est endommagée. Une exposition à une source lumineuse permet ensuite une liaison covalente de ces composés à l'ADN (génomique) des cellules mortes, ce qui entraîne une inhibition de l'amplification de l'ADN lors d'une qPCR ultérieure. Seul l'ADN des cellules vivantes à la membrane intègre (viables) sera alors amplifié par qPCR (voir p.85).

L'essai à la résazurine est basé sur l'activité métabolique des cellules. La résazurine est un composé bleu non fluorescent qui, lorsqu'il est métaboliquement réduit, produit la résorufine, de couleur rose et fluorescente (λ excitation : 570 nm / λ excitation : 590 nm). La résazurine est ainsi un indicateur d'oxydoréduction et d'activité métabolique ; en effet, elle peut être réduite biologiquement par différentes déshydrogénases, ayant comme coenzyme des composés tels que : nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), flavine adénine dinucléotide (FADH), flavine mononucléotide (FMNH), ou les cytochromes (voir p.93).

L'essai à la résazurine est de plus en plus mis en œuvre pour avoir accès notamment à la toxicité de divers composés dans des essais haut-débit (Dalecki et al. 2016; Chen et al. 2018). Elle

remplace en cela l'essai au crystal violet qui caractérise la biomasse totale du biofilm, en réduisant l'analyse à la composante cellulaire et à son métabolisme. Elle est ainsi le plus souvent employée pour étudier les effets d'une diminution de l'activité métabolique de façon relative, par rapport à un témoin non traité (évaluée par une simple diminution de la fluorescence). Bien que des essais de corrélation entre le dénombrement et l'essai à la résazurine ont déjà été menés sur différentes espèces bactériennes (Mariscal et al. 2009; Van den Driessche et al. 2014), cette méthode à notre connaissance n'a pas été utilisée pour de la quantification cellulaire.

Pour chacune de ces méthodes, deux objectifs ont été fixés initialement pour chaque souche bactérienne étudiée :

- Développer une méthode quantitative permettant de corréler, des unités formant colonie (CFU) avec des copies génome dans le cas de la v-qPCR, ou des unités de fluorescence dans le cas de l'essai à la résazurine. Ceci sera réalisé dans un premier temps sur des cultures planctoniques en phase exponentielle de croissance puis comparé avec des cellules bactériennes dans différents états physiologiques.
- Déployer la méthode obtenue pour la quantification de biofilms avant et après traitement par LED UV-C en vue d'évaluer leur efficacité anti-biofilm et de comparer les résultats à une évaluation classique par dénombrement.

1 Méthode moléculaire : EMA – PMA qPCR

La méthode moléculaire PMA ou EMA qPCR, décrite comme rapide, sensible et facile à réaliser nous a semblé prometteuse dans le cadre de notre étude du fait :

1) De la simplicité apparente de cette méthode de quantification des cellules viables (mise en contact de l'intercalant avec l'échantillon suivie d'une extraction de l'ADN et d'une simple qPCR.

2) De l'existence de travaux décrivant son utilisation pour *P. aeruginosa*, y compris sous forme de biofilms (Tavernier and Coenye 2015).

3) Du couplage de la v-qPCR avec un dénombrement sur boîte qui permet, par différence d'évaluer les cellules dormantes (VNBC) et avec une qPCR classique, permettant d'estimer les cellules mortes dans une population bactérienne (Figure 74).

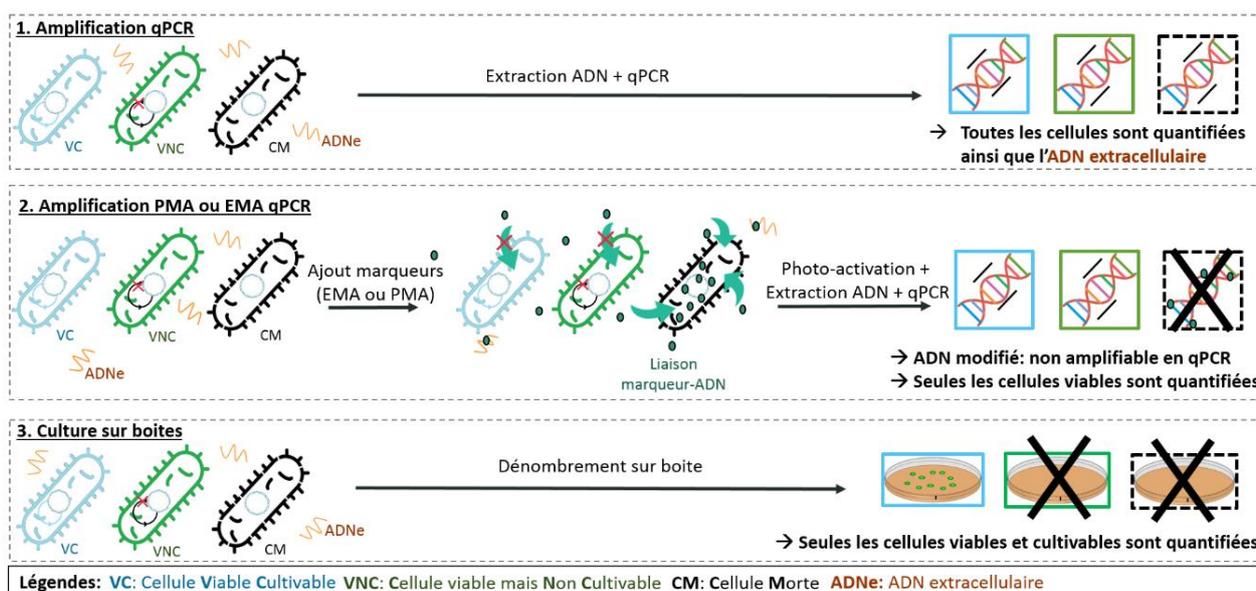


Figure 74 : Schéma résumant la démarche analytique utilisant la v-qPCR pour l'étude de la viabilité cellulaire

Cependant, dans la pratique, l'efficacité de la discrimination entre les cellules viables et non viables par v-qPCR est affectée par de nombreux facteurs, notamment les caractéristiques de la souche bactérienne, le type et la concentration du marqueur, le nombre de cellules mortes ainsi que le rapport entre les cellules viables et les cellules mortes dans les échantillons (Fittipaldi et al. 2012). Le développement de la méthode pour les souches de *L. citreum* et de

P. aeruginosa étudiées demande donc dans un premier temps de définir les conditions de réalisation de la qPCR, puis celles proprement dites de la v-qPCR. Ceci a été réalisé dans un premier temps sur des cellules planctoniques, avant même d'être envisagé sur une population bactérienne récupérée de biofilms.

Cette partie présente donc les résultats, pour les deux souches étudiées, de la calibration en qPCR (validation des amorces, sensibilité, seuil de détection, méthode de lyse) et de l'évaluation de l'inhibition de l'amplification après traitement soit à l'EMA soit au PMA (absence de toxicité cellulaire, pénétration cellulaire, taux de liaison à l'ADN disponible).

1.1 Matériel et méthodes

1.1.1 Cultures bactériennes et dénombrement

Les expérimentations ont été réalisées à partir de cultures en phase exponentielle de croissance des souches *L. citreum* B-1299 et *P. aeruginosa* ATCC 15442 en milieu TS. Pour cela, des bouillons TS ont été inoculés à 4% (v/v) à partir d'une préculture de nuit réalisée dans ce même milieu et incubés à 30°C. Un suivi de la DO à 600 nm a été réalisé toutes les heures, et au bout d'environ 5 heures, 1,5 mL de culture ont été récupérés. La suspension bactérienne est ensuite centrifugée (5000 g pendant 10 min), les cellules sont lavées avec de l'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%) et remises en suspension dans 1,5 mL d'eau physiologique stérile. Cette suspension sera utilisée pour les essais de qPCR et v-qPCR et pour le dénombrement sur boîte.

Un dénombrement par la méthode classique d'étalement sur milieu gélosé de dilutions décimales est réalisé. Ceci permet d'évaluer la population de cellules bactériennes viables et cultivables des suspensions bactériennes (qui sera de l'ordre de 10^8 - 10^9 UFC.mL⁻¹ pour chacune des deux souches).

1.1.2 Méthodes de lyse cellulaire

Différentes méthodes de lyse cellulaire ont été testées : une lyse par traitement thermique, une lyse mécanique avec des billes stériles de différents diamètres et enfin une lyse par des ultrasons.

La lyse par traitement thermique est réalisée en microtube stérile par une incubation de l'échantillon à 100°C pendant 20 min en bain à sec. La lyse mécanique est réalisée avec des

billes de verre petit diamètre (0,10 à 0,25 μm) et des billes de verre de plus gros diamètre. Un équivalent de 0,5 mL de billes est ajouté à la suspension bactérienne qui est ensuite homogénéisée durant 20 min. à l'aide du Vortex Genie® 2 muni d'un adaptateur 13000-V1 (Mobio). Le traitement aux ultrasons a consisté en un traitement total de 6 minutes, sous la forme d'un traitement discontinu de 1 min de traitement suivi d'un temps de pause de 10 secondes. Les tubes ont été maintenus dans la glace lors du traitement du fractionneur sonique modèle 50 muni d'une sonde (Référence : 12961151, Fisherbrand™) à la puissance maximale (50 W).

1.1.3 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN total a été réalisée sur 0,5 mL de culture bactérienne au moyen du kit DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen) selon les indications du fournisseur. Brièvement, l'ADN extrait est élué dans 200 μL de tampon AE (10 mM Tris-Cl ; 0,5 mM EDTA pH 9,0) et les échantillons sont conservés à -20°C .

L'intégrité des différents ADN a été vérifiée par migration en gel d'agarose (0,8 % ; 1h30 à 50 V). La concentration et la qualité des ADN extraits ont été évaluées par spectrophotométrie (Genova Nano, Jenway) et en parallèle la quantification a également été réalisée par fluorimétrie grâce au kit Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay (Invitrogen) en utilisant une gamme étalon (ADN λ) avec des concentrations allant de 0 à 1000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. L'intensité de fluorescence émise à 520 nm (excitation à 485 nm) a été mesurée avec le FLUOstar Optima (BMG Labtech). La concentration des ADN extraits a été estimée de l'ordre de 15 à 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

1.1.4 Conditions q-PCR

1.1.4.1 Amorces utilisées

Différentes amorces ont été utilisées, dont deux issues de la littérature (Tableau 13). Cependant, pour l'amplification de *L. citreum* les amplicons générés par le couple d'amorces décrits sont de grande taille (> 1 000 pb).

Par conséquent, différents couples d'amorces spécifiques de l'espèce *L. citreum* ont été définis lors de cette étude en alignant les séquences codant pour l'ARNr 16S disponibles pour cette espèce sur le site RNACentral (<https://rnacentral.org/>) grâce au logiciel d'alignement multiple Seaview version 4 (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>, (Gouy et al. 2010)). La spécificité et la stabilité des 7 couples d'amorces ont été ensuite validées à l'aide de l'outil logiciel

PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, (Ye et al. 2012)) et OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, (Kibbe 2007)). Un couple d'amorces, LeucoF2/LeucoR7, générant un amplicon de 180 pb, a ainsi pu être sélectionné et validé par PCR conventionnelle.

Tableau 13 : Amorces utilisées lors de cette étude

Souche cible	Gène ciblé	Nom	Sens	(5'--> 3')	Taille amplicon (pb)	Tm (°C)	GC%	Références
<i>L. citreum</i>	16S rDNA	Lcit-f	Forward	AAAACCTTAGTATCGC ATGATATC	1298	52,6	30,4	(Lee et al. 2000)
		Lcit-r	Reverse	CTTAGACGACTCCCT CCCG		58,6	63,2	
		Leuco F2	Forward	TGAGTAACACGTGGA CAACC	180	57,8	50	Cette étude
		Leuco R7	Reverse	GCATCATCGTCTTGG TAAG		53,6	47,4	
<i>P. aeruginosa</i>	OprL	OPR-1	Forward	GACGTACACGCGAAA GACCT	98	60,4	55	(Zhang et al. 2015)
		OPR-2	Reverse	GCCCAGAGCCATGTT GTA CT		60	55	

Les différentes amorces utilisées ont été achetées chez Eurogentec ou Eurofins, et fournies sous forme déshydratée. Elles sont remises en suspension en eau qualité biologie moléculaire (sans DNases et RNases) à une concentration stock de 100 µM, et ont ensuite été conservées à -20°C.

1.1.4.2 Conditions d'amplification qPCR

Les réactions d'amplification ont été effectuées à l'aide du thermocycleur en temps réel CFX Connect™ (Biorad) et analysées avec le logiciel Bio-Rad CFX Manager™ version 3.1. Elles ont été réalisées en plaques de 96 puits en utilisant le mix qPCR iTaq contenant du SYBR-Green (iQ universal SYBER Green supermix 2X, Biorad). Chaque réaction de qPCR est réalisée à deux concentrations d'ADN (solution d'ADN non diluée et diluée au 1/10) dans un volume réactionnel final de 20 µL en utilisant 2 µL d'ADN matrice (environ 30-50 ng). Le mix réactionnel est composé de 10 µL du mix iTaq et de 1 µL de chacune des deux amorces à 500 mM final. Le mix est complété avec 6 µL d'eau qualité biologie moléculaire (sans DNase et RNase).

La réaction qPCR comporte une étape de dénaturation initiale de 10 min à 95°C, suivie de 35 cycles d'amplification en trois étapes : une étape de 30 secondes à 95°C pour la dénaturation de l'ADN, puis une étape de 30 s d'hybridation des amorces, respectivement à 55°C et 60°C pour les échantillons d'ADN de *L. citreum* et *P. aeruginosa*, et une étape d'élongation des

amorces à 72°C pendant 30 secondes, et enfin d'une étape d'extension finale de 5 min à 72°C. À la fin des cycles, une courbe de fusion est réalisée, avec une variation de température de 65°C à 95°C afin de s'assurer qu'un unique produit d'amplification a été généré.

Chaque run de qPCR comprend la série d'échantillons à analyser, un contrôle sans ADN matrice et la gamme d'ADN standard.

1.1.4.3 Quantification en ADN des échantillons

Une droite de calibration donnée en Ct en fonction du \log_{10} du nombre de copies génome/puits a été réalisée à partir de dilutions décimales (en eau qualité PCR) d'une solution d'ADN génomique calibrée pour chacune des deux souches bactériennes. À partir de cette droite, le calcul de l'efficacité de la réaction qPCR, permettant d'évaluer la performance de la réaction d'amplification (proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification) a été réalisé via la relation $E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$.

Afin de faciliter la comparaison entre les résultats de qPCR (Ct, relié à la quantité d'ADN/puits par la courbe de calibration) et les valeurs de dénombrements en CFU.mL⁻¹, le nombre de copies génome (cg) a été calculé (site EndMemo, <http://www.endmemo.com/>) en tenant compte de la taille du génome et du nombre d'exemplaires du gène cible dans le génome: pour *P. aeruginosa* ATCC 15442 taille de 6,77 Mpb (Wang et al. 2014b) et gène *oprL* unique, pour *L. citreum* 1299 taille de 1,75 Mpb et 3 exemplaires du gène ADNr 16S (Passerini et al. 2015). Cette valeur est ensuite transformée en nombre de cellules.mL⁻¹ en tenant compte des différentes étapes du protocole.

1.1.5 Traitement au PMA ou EMA des cultures bactériennes

Deux agents intercalants ont été utilisés lors de notre étude : l'éthidium mono-azide (EMA) ou 3(8)-amino-8(3)-azido-5-ethyl-6-pheny phenanthridinium chloride (Biotium) et le propidium mono-azide (PMA) ou henanthridium ou 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylme-thylammonio) propyl]-6-phenyl dichloride (Biotium).

L'EMA, conditionné déshydraté, a été dissous dans de l'éthanol à 70° puis dilué en eau qualité biologie moléculaire selon les indications du fournisseur, afin d'obtenir une concentration finale de 1 mM. La solution commerciale de PMA, à 20 mM en eau, a été diluée en eau (qualité biologie moléculaire) pour avoir une concentration finale à 1 mM. Ces deux solutions d'intercalants ont ensuite été conservées à l'obscurité à -20°C.

Les marqueurs, EMA ou PMA, ont ensuite été ajoutés à la suspension bactérienne (p. 217) à une concentration finale de 50 μ M. La mise en contact du marqueur avec les cellules est réalisée avec agitation (Assistent RM5, 30 rpm), à l'obscurité pendant 5 min ou 1h. Les échantillons ont ensuite été soumis à une phase d'éclairage de 10 min avec une LED émettant à 460 nm (My-Led® Référence 812012, commercialisée sur le site <http://www.ampoule-leds.fr>) placée à environ 20 cm du microtube. Cette étape de photo-activation des marqueurs est réalisée en condition d'agitation.

L'ADN total des échantillons est par la suite extrait (p. 218) et amplifié en qPCR comme énoncé précédemment (p. 218). À noter que les molécules de PMA/EMA non liées seront éliminées lors de l'étape d'extraction de l'ADN.

En parallèle pour chaque analyse, un témoin a été réalisé (témoin cellule intacte avec marqueur). De plus, les essais n'ont été réalisés qu'une seule fois.

Un certain nombre de ces paramètres ont été fixés par rapport aux conditions utilisées par (Tavernier and Coenye 2015) sur *P. aeruginosa* : concentration en PMA/EMA, agitation lors de l'incubation avec le PMA/EMA, utilisation d'une lampe LED pour la photoactivation et une durée de photoactivation de 10 min, absence d'étape de centrifugation avant l'étape d'extraction de l'ADN.

1.1.6 Traitement statistique

Les données ont été analysées avec PRISM version 4 (GraphPad software). Les résultats sont considérés statistiquement différents lorsque la P value est $< 0,05$. La comparaison des résultats obtenus avec les différents échantillons est réalisée par une analyse ANOVA (Analysis of variance) complétée par le test paramétrique de Newman-Keuls. De plus, les données comparées deux à deux sont réalisées grâce au t-test ($p < 0,05$).

1.2 Résultats et discussion

1.2.1 Quantification de *P. aeruginosa* et de *L. citreum* par qPCR

Dans le cas de *P. aeruginosa*, les amorces Opr1/2 définies par (Zhang et al. 2015) et ciblant le gène unique *oprL* codant pour une lipoprotéine membranaire (peptidoglycan-associated outer membrane protein) ont bien permis de générer un seul type d'amplicon. Dans les conditions utilisées, il est possible de quantifier de 1.10^1 à 1.10^6 copies génome (cg), ce qui correspond à 10^3 à 10^8 cellules.mL⁻¹. L'efficacité d'amplification moyenne est de $97,1 \pm 15,3\%$ ($R^2=0,997 \pm 0,02$), Figure 75.

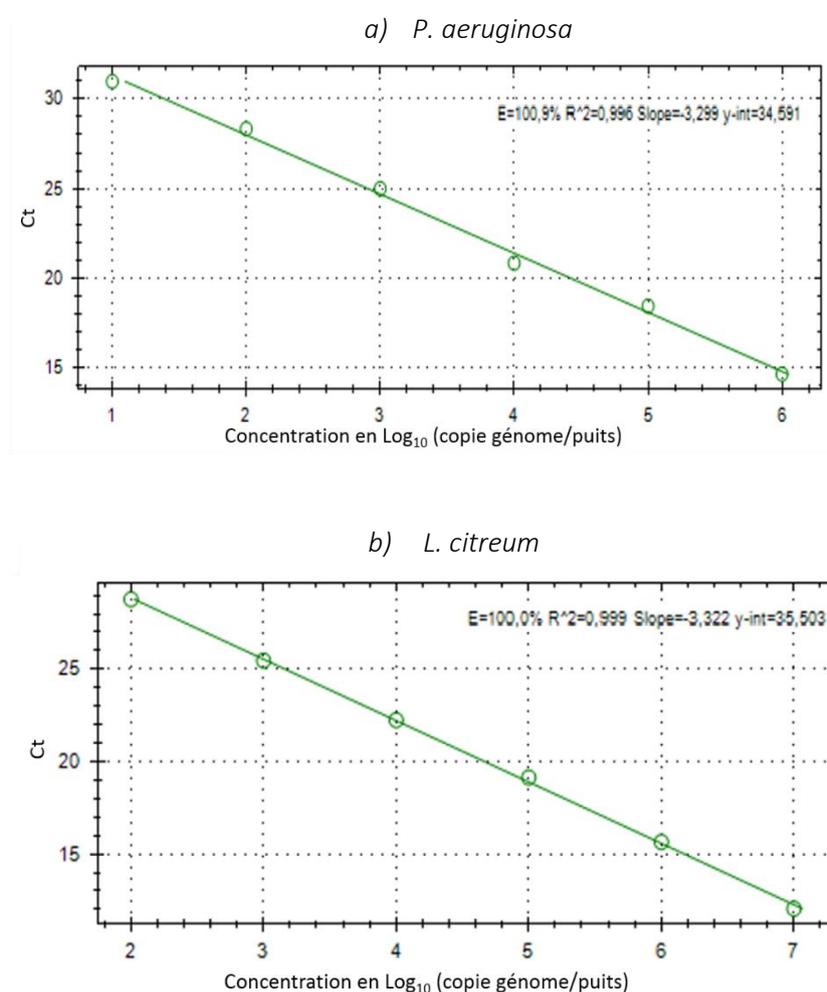


Figure 75 : Amplification des souches modèles en qPCR, de l'ADN génomique, avec en a) Utilisation des amorces Opr1/2 sur *P. aeruginosa* ATCC 15442, b) Utilisation des amorces dessinées Leuco F2/R7 sur *L. citreum* B-1299

Dans le cas de *L. citreum*, des essais préliminaires avec les amorces Lcitr/Lcitr définies par Lee et al. (Lee et al. 2000) ciblant l'ADNr16S et utilisées pour différencier *L. citreum* de *L. mesenteroides* ont montré que ces amorces ne sont pas adéquates pour l'amplification par

qPCR. En effet, l'efficacité de la réaction d'amplification n'était que de 43,3%. Cette faible efficacité peut être due à la taille trop importante des amplicons générés (1298 pb). La qPCR nécessite en effet l'utilisation d'amorces générant des amplicons de petite taille (de 80 à 300 pb) afin d'augmenter la robustesse de la méthode. Par conséquent, de nouvelles amorces ont été définies au cours de cette étude, Leuco F2/LeucoR7, ciblant également le gène codant pour l'ADNr 16S mais générant un amplicon de 180 pb à partir de l'ADN génomique de *L. citreum* B-1299. Dans les conditions utilisées, il est possible de quantifier de 1.10^2 à 1.10^7 copies génome, ce qui correspond à 1.10^4 à 1.10^9 cellules.mL⁻¹. L'efficacité d'amplification moyenne est de $102,9 \pm 8,75\%$ ($R^2=0,999 \pm 0,0005$), Figure 75. Les résultats qPCR avec les courbes d'amplification et la courbe de fusion sont disponibles en annexe (Annexe 7).

Les conditions et les amorces définies permettent donc pour les deux souches étudiées une quantification reproductible par qPCR et donnent des résultats équivalant à ceux qui sont obtenus par dénombrement. Dans le cas de *P. aeruginosa*, nous obtenons même un seuil de détection plus faible (10^3 cellules.mL⁻¹) que celui décrit par (Tavernier and Coenye 2015) qui était de 10^5 cellules.mL⁻¹ en ciblant le gène *gyrB*.

1.2.2 Comparaison de quatre méthodes de lyse cellulaire

La mise en place de la méthode v-qPCR nécessite de disposer d'un échantillon témoin dans lequel l'ensemble des cellules bactériennes sont lysées, c'est-à-dire qui ont des systèmes membranaires endommagés (témoin 100% de cellules mortes). Pour cela, nous avons privilégié l'utilisation de méthodes de lyse par des traitements physiques et non des moyens chimiques afin d'éviter l'ajout des composés dans la suspension bactérienne susceptibles d'interférer avec l'action du PMA/EMA.

Quatre méthodes différentes de lyse cellulaire ont été comparées, une technique de traitement thermique et trois techniques de lyse mécanique, sur des suspensions d'environ 10^9 CFU.mL⁻¹ en phase exponentielle de *L. citreum*.

L'estimation de la population bactérienne avant et après traitement de lyse a été réalisée à la fois par dénombrement classique (UFC.mL⁻¹) et par qPCR (ramené en cellules.mL⁻¹) permettant d'avoir ainsi une quantification des cellules viables (et cultivables) et de l'ensemble des cellules (mortes et vivantes). Les résultats sont présentés dans la Figure 76. Dans le cas de l'échantillon témoin (aucun traitement de lyse), les deux méthodes de quantification de la population bactérienne donnent bien des résultats identiques. Seul le traitement thermique de 20 min à

100°C conduit à une absence de colonies lors des dénombrements en milieu solide (inférieur au seuil de détection de 10 UFC.mL⁻¹). Cependant, l'analyse par qPCR ne permet pas de retrouver la valeur de 10⁹ cellules.mL⁻¹, les résultats suggèrent que le traitement thermique induit une perte d'ADN d'un peu plus d'1 log₁₀ (valeur 1,4 log₁₀ ± 1,02). D'après le dénombrement sur boîte, dans les conditions utilisées, l'utilisation des ultrasons ou des billes de verre de gros diamètre n'a pas d'effet significatif sur la viabilité cellulaire. La lyse avec les billes de verre de faibles diamètres réduit la population de cellules viables de seulement 3 log₁₀ environ. L'analyse par qPCR ne donne pas de résultats statistiquement différents par rapport au témoin pour ces 3 méthodes de lyse mécanique et semble donc permettre de quantifier la totalité de l'ADN initialement présent.

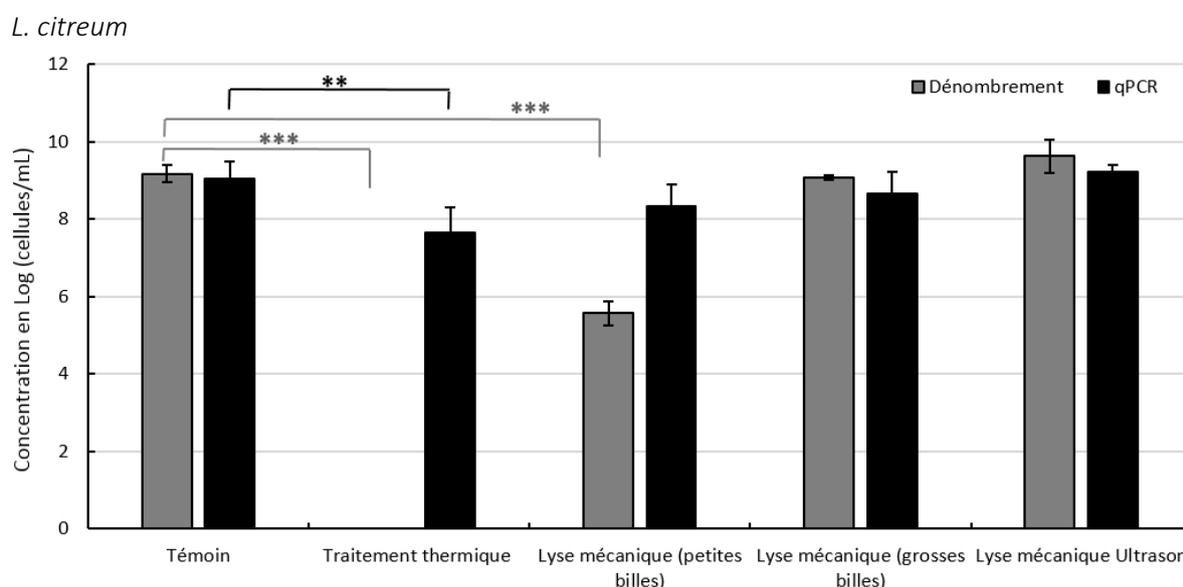


Figure 76 : Comparaison des différentes méthodes de lyse sur une suspension de *L. citreum* : concentration en cellule.mL⁻¹ déterminée par dénombrement et par qPCR. Témoin et traitement thermique n=5, Traitement mécanique n=2. Test ANOVA Newman-Keuls (P< 0,05)

Au vu de ces résultats, seule la lyse thermique permettrait, une perte totale de la viabilité pour la souche *L. citreum* par conséquent seule la méthode de lyse par traitement thermique a été évaluée pour *P. aeruginosa*.

Les résultats sont similaires pour la souche *P. aeruginosa*, le traitement thermique induit une absence de colonies lors des dénombrements en milieu solide (inférieur au seuil de détection de 10 UFC.mL⁻¹) (Figure 77). Cependant, le traitement ne semble pas induire une perte d'ADN.

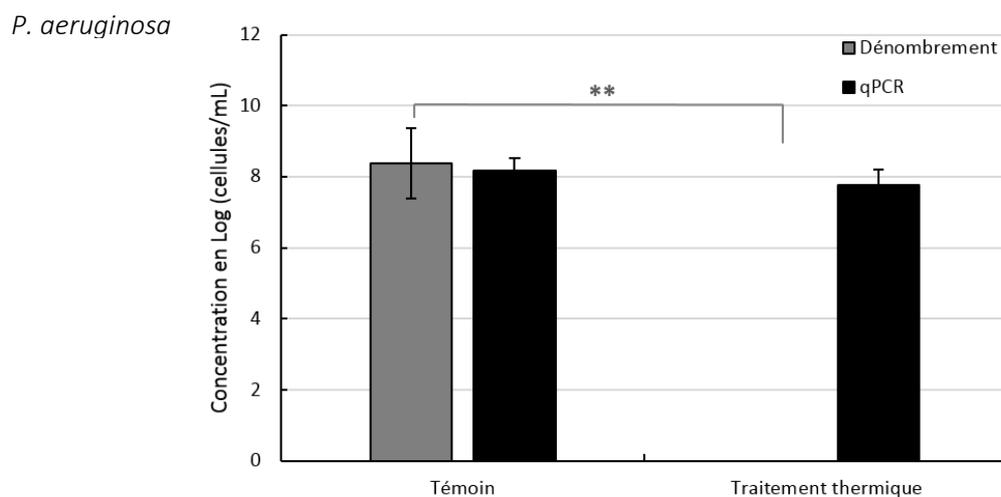


Figure 77 : Efficacité de lyse thermique pour une suspension de *P. aeruginosa* : La concentration est en cellules.mL⁻¹ déterminée par dénombrement et par qPCR. Témoin et traitement thermique n=3. T-test ($P < 0,05$)

La technique de lyse cellulaire retenue pour la suite de l'étude sera donc celle par traitement thermique de 20 min à 100°C car elle permet de lyser la totalité des cellules bactériennes de *L. citreum* et *P. aeruginosa*. Ceci est en accord avec différentes études qui montrent qu'un traitement thermique (de 70°C à 121°C pendant quelques secondes à 4 h) est le plus adéquat pour obtenir un maximum de cellules bactériennes avec une membrane compromise du fait de son action sur la dénaturation des protéines membranaires et pariétales (Barbau-Piednoir et al. 2014; Vondrakova et al. 2018). Par exemple, a été observée une diminution de l'intégrité membranaire de plus de 98% par rapport à la population initiale après une incubation sur *Salmonella enterica* pendant 15 min à 99°C (Barbau-Piednoir et al. 2014). C'est d'ailleurs le traitement de lyse cellulaire le plus souvent employé à côté d'un moyen chimique tel que l'ajout d'isopropanol à 70% pour déshydrater les cellules. Les traitements mécaniques (congélation, congélation/décongélation successives), comme nous l'avons également mis en évidence, donnent des effets plus limités (Barbau-Piednoir et al. 2014; Vondrakova et al. 2018). Cependant, ce traitement induit une perte d'ADN pour *L. citreum* (limitée à 1 log₁₀) dont il faudra tenir compte afin de ne pas surestimer l'efficacité de liaison des marqueurs PMA et EMA à l'ADN. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été identifié par certains auteurs (Reyneke et al. 2017; Vondrakova et al. 2018).

1.2.3 Évaluation de l'efficacité des marqueurs EMA/PMA

La démarche expérimentale mise en œuvre pour évaluer l'efficacité des intercalants est résumée dans la Figure 78.

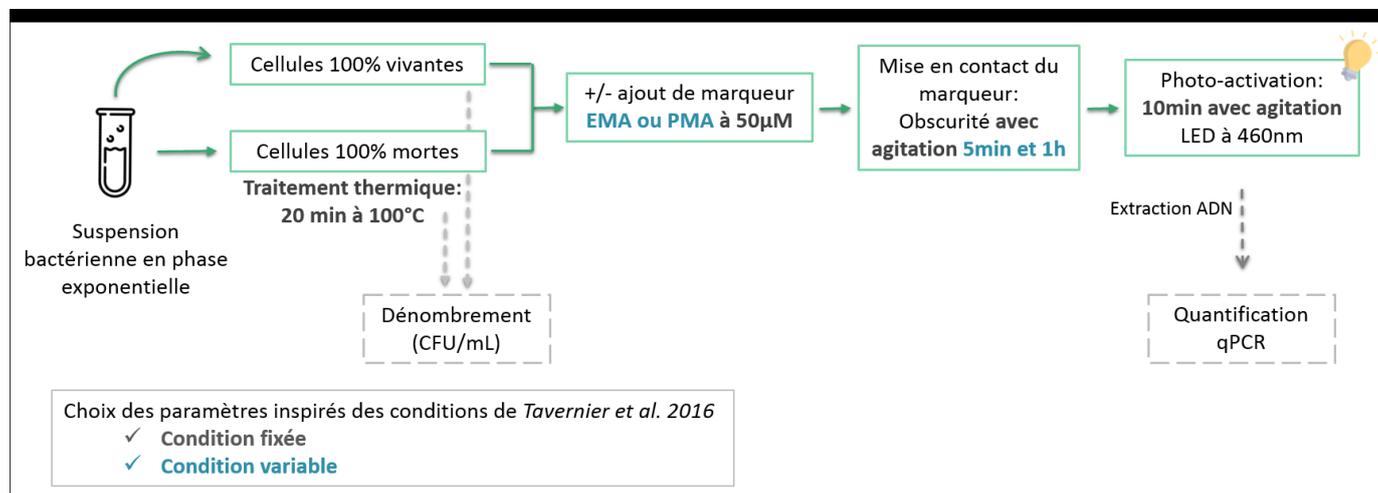


Figure 78 : Démarche expérimentale marquage EMA et PMA sur suspensions bactériennes

1.2.3.1 Diffusion cellulaire des marqueurs

Il a été décrit dans certaines études que l'EMA peut entrer au niveau intracellulaire chez certaines souches bactériennes, alors même que les cellules ont conservés leur intégrité membranaire, et que cette diffusion serait moindre dans le cas du PMA (Nocker et al. 2006; Reyneke et al. 2017). Pour déterminer ce qu'il en est dans nos conditions expérimentales, une expérience préliminaire a été réalisée pour les 2 marqueurs et les 2 souches bactériennes. Des suspensions (0,5 mL) de cellules intègres (en phase exponentielle de croissance) ont été incubées avec 50 µM de PMA ou EMA pendant soit 5 minutes soit 1 heure. Ces échantillons ont ensuite été quantifiés en qPCR et comparés à un témoin n'ayant reçu aucun traitement. Les résultats (Figure 79) sont donnés en réduction du signal calculé par rapport au témoin : réduction logarithmique du nombre de cellules.mL⁻¹ entre l'essai et le témoin non traité.

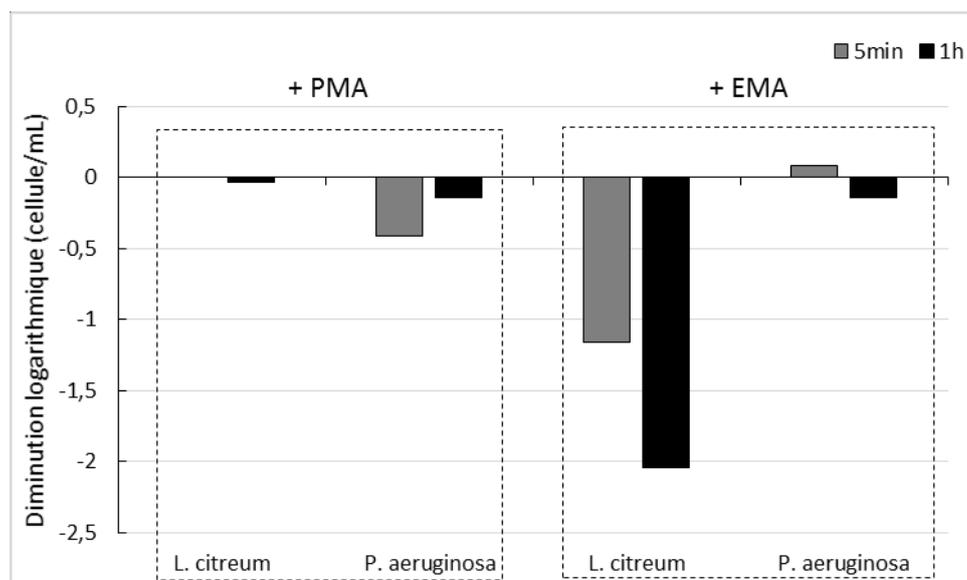


Figure 79 : Évaluation de la perméabilité cellulaire de cellules viables de *L. citreum* et *P. aeruginosa* aux marqueurs PMA et EMA après 5 min (en gris) et 1 h de mise en contact (en noir)

Dans les conditions utilisées, le PMA ne semble pas entrer au niveau intracellulaire chez *L. citreum* (Figure 79). Même au bout d'une heure d'incubation, la quantification en cellules est identique avec ou sans traitement PMA. Pour *P. aeruginosa*, une faible diminution du signal est observée, du même ordre de grandeur après 5 min ou 1h d'incubation ; cette valeur reste cependant inférieure à 0,5 log₁₀.

En ce qui concerne l'EMA, les résultats sont nettement différents puisqu'on observe pour *L. citreum* une réduction du signal de plus de 1 log₁₀ dès 5 min. de contact et jusqu'à 2 log₁₀ au bout d'1 heure. Il est donc clair que l'EMA ne pourra pas être utilisé en v-qPCR dans le cas de *L. citreum*, l'EMA diffusant de façon trop importante au niveau intracellulaire malgré la présence d'une membrane intacte. En revanche, l'EMA ne diffuse pas au niveau intracellulaire dans le cas de *P. aeruginosa*, même au bout d'une heure de contact.

Cette expérience montre donc que le PMA peut être utilisé à la fois pour *L. citreum* et *P. aeruginosa*, alors que l'EMA n'est pas adapté à la quantification des cellules viables de *L. citreum*. Cette différence de diffusion passive pourrait s'expliquer par des caractéristiques pariétales et/ou membranaires différentes entre les deux souches bactériennes (Gram⁻ versus Gram⁺) (Nocker et al. 2006).

1.2.3.2 Liaison des marqueurs à l'ADN de cellules mortes

Des cellules lysées par traitement thermique ont été mises en contact soit 5 min soit 1 h avec chacun des deux marqueurs afin de déterminer si ces intercalants se lient efficacement à l'ADN des cellules mortes présentes dans l'échantillon (Figure 80). Ces échantillons ont été comparés à la fois avec un témoin n'ayant pas subi de traitement thermique et avec un témoin de cellules lysées mais non traitées par l'EMA ou le PMA, afin de ne pas surestimer la suppression du signal par les marqueurs comme évoqué dans la partie 1.2.2.

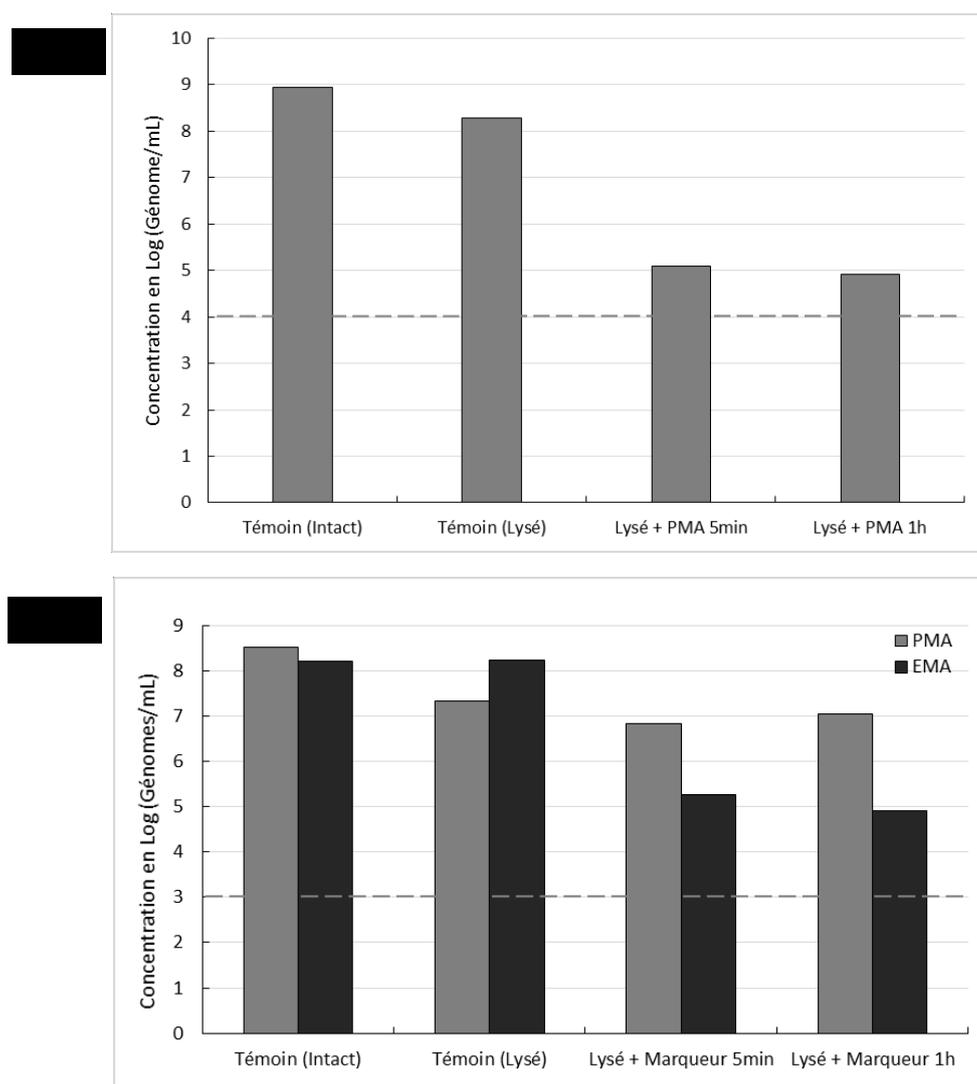


Figure 80 : Évaluation de la capacité des marqueurs à se lier à l'ADN de cellules mortes de, a) *L. citreum* avec le marqueur PMA, b) de *P. aeruginosa* avec le marqueur PMA (gris) et EMA (gris foncé) ; la ligne pointillée correspond à la limite de détection de la méthode qPCR.

Comme évoqué précédemment, un facteur d'environ 1 log₁₀ est retrouvé entre les 2 témoins (100% cellules vivantes, 100% cellules mortes) pour *L. citreum*, aussi bien pour le PMA que

l'EMA. Le même type de résultat est mis en évidence pour *P. aeruginosa*, mais uniquement dans le cas de l'incubation avec du PMA.

Pour *L. citreum*, le marqueur PMA permet une réduction du signal d'environ 4 log₁₀ par rapport à la condition témoin lysé et il ne semble pas y avoir de différence entre 5 min et 1h de contact. Cependant, il reste environ 1 log₁₀ pour considérer que le PMA lie l'ensemble de l'ADN disponible par rapport à la limite de détection de la méthode.

Dans le cas de *P. aeruginosa*, quelle que soit la durée de mise en contact, le marqueur PMA ne se lie que très peu avec l'ADN disponible, la réduction du signal n'est que de 0,5 log₁₀ environ par rapport au témoin lysé sans marqueur. En ce qui concerne l'EMA, la réduction du signal est d'environ 3 log₁₀ dès 5 min de traitement et elle n'augmente pas avec la durée d'incubation. Par conséquent, il reste environ 2 log₁₀ à lier par rapport à la limite de détection. Le marqueur EMA est donc plus efficace que le PMA pour supprimer le signal de l'ADN des cellules mortes chez *P. aeruginosa*, cependant il ne permet pas non plus de lier l'ensemble de l'ADN disponible.

Même si ces résultats demandent à être reproduits, les marqueurs PMA/EMA ne permettent pas, dans les conditions définies et pour les deux souches bactériennes étudiées, de supprimer l'amplification de la totalité de l'ADN disponible des cellules planctoniques mortes dans une population voisine de 10⁹ bactéries.mL⁻¹.

Différents facteurs peuvent être responsables de ces résultats :

- une taille d'amplicon trop faible. En effet, les amorces générant des amplicons de petites tailles (inférieur à 300 pb) sont susceptibles de conduire à une surestimation de la concentration en cellules viables par rapport à des amplicons de grande taille (taille comprise entre 700 et 2800 pb) (Soejima et al. 2008; Contreras et al. 2011; Soejima et al. 2011; Seidel et al. 2017). Ceci peut être mis en relation avec le fait que plus la séquence sera longue, plus la probabilité de liaison covalente du marqueur sera grande. Or les amorces utilisées dans cette étude génèrent des amplicons de 180 pb et de 98 pb pour respectivement *L. citreum* et *P. aeruginosa*, ce qui pourrait expliquer que l'inhibition par le marqueur est plus efficace pour *L. citreum*.

- une trop forte concentration cellulaire des suspensions (environ 5.10⁸ cellules.mL⁻¹ pour *P. aeruginosa* ; 1.10⁹ cellules.mL⁻¹ pour *L. citreum*). Or, Slimani et al. 2012 ont montré qu'à une concentration supérieure à 10³ cellules.mL⁻¹ le marquage PMA ne permet pas de supprimer le

signal des cellules mortes restantes (Slimani et al. 2012). Ainsi, les cellules mortes peuvent interférer et entraîner une surestimation des cellules vivantes (Schmidlin et al. 2010; Løvdal et al. 2011). Cela peut aussi être dû à la turbidité de l'échantillon qui interfère sur l'étape de photo-activation (Taylor et al. 2014).

- un défaut de pénétration du PMA/EMA dans les cellules lysées. Il faut en effet que le marqueur ne diffuse pas dans les cellules intactes mais qu'il soit aussi capable de pénétrer de façon efficace dans les cellules bactériennes endommagées. L'augmentation de la perméabilité cellulaire peut être réalisée par l'ajout de détergents (Wang et al. 2014a; Takahashi et al. 2017), par modification de la température de mise en contact du marqueur (Pan and Breidt 2007; Soejima et al. 2011). Plus récemment, il a été montré qu'en combinant le marqueur EMA et PMA cela permet une nette amélioration de la technique (Codony et al. 2015).

1.3 Conclusion

Nous avons pu montrer par ces expériences que dans le cas de suspensions bactériennes de *P. aeruginosa* et *L. citreum*, le PMA et EMA sont bien capables de se lier à l'ADN de cellules mortes (lysées par traitement thermique 20 min à 100°C) et d'inhiber son amplification par qPCR. Nous avons également mis en évidence que, dans les conditions définies, l'ensemble de l'ADN disponible n'est pas modifié, ce qui peut donc conduire à une sous-estimation des cellules mortes lors d'une application de la v-qPCR à l'évaluation d'un traitement biocide. Par conséquent, nous avons décidé de ne pas aller plus loin dans la mise au point du protocole sur cellules planctoniques ainsi que dans sa mise en œuvre dans le cas de biofilms. En effet, en parallèle, des essais d'extraction d'ADN à partir de cellules bactériennes issues de biofilms par différentes méthodes n'ont pas permis d'extraire la totalité de l'ADN bactérien. Il y aurait donc également à ce niveau besoin d'optimiser la méthode en faisant varier différents paramètres afin d'arriver à un protocole efficace et reproductible.

2 Méthode métabolique d'évaluation de la viabilité cellulaire : Résazurine

Dans cette dernière partie, les travaux présentés décrivent la mise au point d'un essai à la résazurine pour quantifier la viabilité cellulaire en tenant compte de différents verrous technologiques identifiés lors de l'étude bibliographique (voir p.93) :

- L'élargissement de la gamme de concentration cellulaire pouvant être quantifiée ;
- L'utilisation de l'essai pour des souches bactériennes acidifiant le milieu de culture, comme dans le cas de *L. citreum*, et qui génèrent une perte du signal fluorescent du fait d'une réduction chimique de la résorufine.

Pour cette étude, il a été fait le choix de cultiver les deux souches bactériennes dans un même milieu de culture afin de limiter des différences sur ce plan ; le milieu trypticase soja (TS, Annexe 8) a ainsi été retenu pour cultiver les deux souches et leur croissance a été caractérisée dans ce milieu en termes de concentration cellulaire et de pH.

Puis, en accord avec la démarche générale décrite p.212, une calibration de l'essai à la résazurine a été réalisée au départ pour des cellules en phase exponentielle de croissance. Les modifications majeures de l'essai proposé par rapport à ce qui est déjà décrit dans la littérature sont : (i) une approche cinétique sur une large gamme de concentrations cellulaires ; (ii) la détermination et l'utilisation de paramètres cinétiques ; (iii) l'utilisation d'une concentration élevée de résazurine (2 mM final).

Le protocole établi a ensuite été appliqué à des cellules présentant différents états physiologiques : planctoniques en phase stationnaire, bactéries déposées sur membrane, et biofilms de 24 heures.

Cette étude a abouti à l'article présenté ci-après pour soumission dans *Journal of Microbiological Methods*.

Principaux résultats

La cinétique de croissance planctonique sur 20 heures est similaire pour les deux souches en milieu TS, avec une phase exponentielle qui se situe entre 3 à 6 heures de culture, et l'atteinte de la phase stationnaire après 10 heures. Le pH se maintient proche de la neutralité pour *P.*

aeruginosa. En revanche pour *L. citreum*, le pH décroît rapidement de 7,0 à 5,5 après 10 heures, avant de se stabiliser au-dessus de 5,0 du fait de la production importante d'acides organiques (lactique, acétique) lors de sa croissance.

La calibration de l'essai à la résazurine a été réalisée au départ sur des gammes de concentrations cellulaires des deux souches à partir d'une suspension en phase exponentielle de croissance (prélèvement après 5h de culture en milieu TS). Chaque suspension bactérienne à analyser est diluée en série au 1/10 dans du milieu TS de façon à couvrir une concentration de 10^3 à 10^7 CFU.mL⁻¹. Ensuite 180 µL de chaque dilution sont déposés en microplaque 96 puits et 20 µL de solution de résazurine à 20 mmol.L⁻¹ dans du PBS préalablement filtrée (0,22 µm) sont ensuite rajoutés dans chaque puits. L'émission de la fluorescence de la résorufine est ensuite mesurée toutes les 10 minutes pendant 20 h à 30°C en lecteur de microplaques (FLUOstar BMG Labtech). Dans notre cas d'une approche cinétique sur plusieurs heures, la concentration en résazurine ne doit pas être limitante ; c'est pourquoi nous avons utilisé une concentration finale de 2 mmol.L⁻¹, beaucoup plus élevée que ce qui est généralement pratiqué (valeurs comprises suivant les études entre 20 et 800 µmol.L⁻¹). En effet, des essais antérieurs du laboratoire avaient montré qu'une concentration de 20 µmol.L⁻¹ (concentration la plus souvent utilisée) conduisait à une consommation totale de la résazurine par *P. aeruginosa* en 2 heures, avec un signal de la fluorescence stable uniquement entre 2 et 5 heures (Randrianjatovo-Gbalou et al. 2015). L'absence de toxicité d'une telle concentration de résazurine pour les deux souches bactériennes utilisées dans notre étude a été vérifiée par un test sur le principe d'un antibiogramme.

Pour *P. aeruginosa*, la cinétique comporte 3 phases principales : une phase de latence, une phase exponentielle et un plateau, à saturation du signal fluorescent (Figure 2A). La durée des phases de latence et « stationnaire » dépend de la concentration cellulaire testée.

Pour *L. citreum*, le signal a été trouvé plus complexe, avec une phase de latence, une phase exponentielle puis une phase de déclin de fluorescence, cette séquence pouvant être reproduite en fonction des concentrations cellulaires testées (Figure 2B). Ce signal traduit la coexistence des deux types de réactions : la réduction métabolique de la résazurine 'bleue non fluorescente' en résorufine 'rose fluorescente' permettant l'augmentation du signal et la réduction chimique de la résorufine en déshydrorésorufine 'incolore et non fluorescente', due à l'acidification du milieu par *L. citreum* et entraînant la diminution du signal.

Pour chaque cinétique obtenue, trois temps caractéristiques ont ensuite été calculés : (i) le temps nécessaire pour atteindre la pente maximale ascendante, soit le point d'inflexion de la courbe (TMS pour « *time to maximum rising slope* ») ; (ii) le temps nécessaire pour atteindre le seuil de 30 000 RFU (TT pour « *time to threshold* »), (iii) le temps nécessaire pour atteindre la fluorescence maximale (TM pour « *time to maximum value* »). Ce dernier paramètre n'a pas pu être calculé pour *P. aeruginosa* dans la mesure où il se produit une saturation du signal de fluorescence ne permettant pas donc de déterminer une valeur maximale. Des gammes de concentrations ont ensuite été établies en reportant le nombre de cellules dans la suspension initiale (en CFU.mL⁻¹) avec les temps caractéristiques correspondants (TMS, TT ou TM).

Pour la souche de *P. aeruginosa*, les temps TT et le TMS ont montré une bonne corrélation avec la concentration cellulaire ($r^2 > 0,97$; figure 3A). En ce qui concerne *L. citreum*, les trois temps caractéristiques sont bien corrélés au nombre de cellules ($r^2 > 0,98$; figure 3B). Pour la suite du travail, le choix a été fait de ne prendre en compte que le TMS qui permet de considérer à la fois la réduction de la résazurine et la réduction chimique de la résorufine. Ainsi, une droite d'étalonnage a été définie pour chaque souche sur une large plage de concentrations cellulaires, allant de 10³ à 10⁷ UFC.mL⁻¹.

Le protocole a ensuite été appliqué sur des cellules dans différents états physiologiques : cellules en phase stationnaire (environ 18 h de culture), cellules déposées sur membrane (SSB) et cellules issues de biofilms de 24 heures. Pour ces deux derniers types d'échantillons, les cellules ont dû bien évidemment être détachées du support et remises en suspension en milieu TS pour pouvoir procéder à l'essai (voir p.126). Pour chaque état physiologique, une droite a pu être établie entre la concentration cellulaire et le temps nécessaire pour atteindre la pente ascendante maximale (TMS, voir Figure 2). Les pentes de ces droites ont alors été utilisées pour comparer l'activité métabolique des cellules dans les différentes conditions (Figure 4). Pour les deux souches bactériennes, les pentes obtenues ont montré que les cellules échantillonnées en phase stationnaire se comportaient de la même manière que les cellules en phase exponentielle. En revanche, le métabolisme de la résazurine est différent pour les cellules déposées sur membranes (SSB) et les biofilms. Ainsi, l'essai permet de quantifier des cellules présentant différents états physiologiques et est de plus assez sensible pour les différencier.

Discussion

La résazurine est à ce jour un outil couramment utilisé pour évaluer la viabilité de suspensions planctoniques ou de biofilms bactériens après des traitements biocides selon des protocoles très variables, mais reposant généralement sur une mesure de fluorescence en point final sur une suspension ou un biofilm à une concentration cellulaire unique (Augustin et al. 2004; Mariscal et al. 2009; Akinbobola et al. 2017). Les résultats sont ensuite exprimés en tant que réduction relative (%) par rapport à un contrôle négatif non traité. Un travail de normalisation a donc déjà fait l'objet de réflexions et a conduit à un protocole proposé par (Vandecandelaere et al. 2016).

De plus, bien que la résazurine soit utilisée depuis des décennies pour évaluer la contamination du lait (Feuillat et al. 1971), certains auteurs ont récemment conclu à la non-adéquation de l'essai utilisé en point final pour l'évaluation de bactéries lactiques (*L. mesenteroides* et *Lactobacillus plantarum*) qui, en acidifiant le milieu, entraînent la réduction chimique de la résorufine et la perte de fluorescence (Jung et al. 2017).

En effet, les cinétiques de fluorescence de *L. citreum* ont clairement montré qu'avec une approche en point final et des concentrations cellulaires inconnues, une donnée de fluorescence unique ne permet pas de quantifier les suspensions bactériennes de concentration inconnue. L'approche dynamique développée ici permet la prise en compte de la réduction chimique de la résorufine en dihydrorésorufine non fluorescente, ainsi que d'autres comportements spécifiques des espèces bactériennes utilisées. Par exemple, plusieurs auteurs (Mariscal et al. 2009; Van den Driessche et al. 2014) ont décrit que *P. aeruginosa* ne produit un signal fluorescent qu'après une période de latence, même à des concentrations cellulaires élevées. Dans une approche basée sur la fluorescence ou l'absorbance en point final, l'existence d'une telle phase de latence a dû être prise en compte en obligeant à définir préalablement le moment adéquat de la mesure (Vandecandelaere et al. 2016).

Plus largement, cet apport méthodologique pourrait permettre également de quantifier les cellules dans des milieux contenant des composés réducteurs tels que le cuivre (Doll et al. 2016) ou l'acide ascorbique (Natto et al. 2012) qui interfèrent également avec les propriétés d'émission de fluorescence du réactif à la résazurine.

L'utilisation de l'approche cinétique combinée avec l'utilisation du TMS permet de quantifier de 10^3 à 10^7 UFC.mL⁻¹ pour les deux souches étudiées, en accord avec (Van den Driessche et al.

2014) qui ont ouvert la voie de l'approche dynamique de l'essai à la résazurine. Une telle gamme de concentrations est particulièrement intéressante dans le cadre d'essais d'évaluation d'activité biocide dont l'objectif est d'obtenir une réduction de la population bactérienne de plusieurs log.

L'application de la méthode aux différents types de biofilms modèles a montré une bonne corrélation entre la concentration cellulaire et le TMS (r^2 toujours supérieur à 0,9). Cependant, lors de la comparaison des pentes (exprimées en $\log_{10}(\text{UFC.mL}^{-1}).\text{h}^{-1}$) obtenues pour les différents états physiologiques, une différence est observée entre les cellules en phase exponentielle et les cellules déposées sur membrane ou les biofilms de 24 h. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Sandberg et al. 2009) qui ont montré que les courbes d'étalonnage des cellules planctoniques n'étaient pas appropriées pour quantifier les cellules viables dans les biofilms de *S. aureus*. Cependant, il faut noter que la manipulation des cellules avant l'essai à la résazurine (lavage, centrifugation) a différé entre les suspensions et les SSB ou les biofilms, pouvant avoir entraîné un stress, et modifié l'activité métabolique. Ce point reste à ce jour à vérifier.

Nos résultats renforcent donc l'importance d'établir une courbe d'étalonnage spécifiquement pour chaque souche bactérienne étudiée, ainsi que pour chaque état physiologique de départ et pour chaque protocole expérimental utilisé.

Enfin, la méthode développée a été appliquée pour étudier l'effet biocide du dispositif LED émettant dans les UV-C à 280 nm sur des bactéries déposées en surface (SSB) de *P. aeruginosa* et *L. citreum*. Les résultats d'efficacité biocide évalués par l'essai résazurine ont été similaires aux résultats obtenus par dénombrement sur boîte, confirmant son applicabilité à l'évaluation de traitements anti-biofilms (résultats complémentaires p. 251). La seule différence entre les deux types d'analyse a été observée pour les cellules de *P. aeruginosa* à la plus faible dose, soulevant la question d'une allocation d'énergie orientée vers la réparation de l'ADN et la gestion du stress.

En conclusion, les objectifs de ce développement méthodologique ont été atteints dans la mesure où l'essai à la résazurine proposé a permis d'améliorer la méthode classiquement utilisée pour l'étude des effets biocides :

- Il a permis de quantifier une souche bactérienne acidifiante telle que *L. citreum*, en surmontant la perte de signal fluorescent due à l'acidité ;
- Il donne la possibilité d'étudier une gamme de concentrations étendue, allant de 10^3 à 10^7 UFC.mL⁻¹ pour les souches et les conditions testées.

A dynamic resazurin assay to quantify planktonic and biofilm cells including lactic acid bacteria

Maritxu Labadie^a, Irina Randrianjatovo-Gbalou^b, Catherine Fontagné-Faucher^a and Claire-Emmanuelle Marcato-Romain ^{a*}

a Université de Toulouse ; UPS, IUT 'A', LBAE EA 4565 (Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale), 24 rue d'Embaquès, F-32000 Auch, France

b Present address : SynHelix, Pépinière Entreprises Génopôle, Campus 3, 4 rue Pierre Fontaine, F-91058 Evry, France

* Corresponding author

Abstract

A resazurin assay based on a dynamic approach was developed by measuring the resorufin fluorescent signal over a 20-hour period. This approach allowed to establish calibration curves for planktonic cells of both *Pseudomonas aeruginosa* and the lactic acid bacterium *Leuconostoc citreum* in a range of concentrations between 10^3 and 10^7 CFU ml⁻¹ for both strains. CFU counts correlated well with the resazurin metabolic activity for agar medium surface-spread bacteria as well as for 24-h grown biofilms.

Keywords

Resazurin, viability quantification, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc citreum*

1 Introduction

Microbial biofilms, which are defined as sessile microorganisms attached to a surface and embedded in a complex self-produced extracellular matrix, have been receiving increasing interest since the end of the 1970's and with the paradigm proposal of Costerton (Costerton 1995). Today, biofilms have detrimental effects in the medical, food and industrial sectors which explain the wide variety of biocides or cleaning techniques developed to control their progression. Analytical methods have been hence needed to better understand the biology of biofilms and to characterize the treatment efficacy, for instance, methods such as high-throughput screening of anti-biofilm compounds. Many studies are now particularly dealing with the development of accurate analytical methods allowing to investigate both the extracellular matrix as well as the cellular components of biofilms. Many methods are available regarding the quantification of the cellular compartment within the biofilm and its viability. Such methods can be divided into four groups (Azeredo et al. 2017): (i) methods based on cell viability with colony forming unit counts (CFU); (ii) methods based on cellular biomass with flow-cytometry measurements; (iii) methods based on cell metabolic activity with XTT or resazurin assays for instance, and iv) methods based on biofilm biomass evaluation with crystal violet staining methods. Each group of methods provides different types of information highlighting the need to combine different methods within one single study. For instance, cell quantification within *Staphylococcus aureus* biofilms showed an overall correlation between the crystal violet binding assay and the XTT assay of only 46.5% (Alonso et al. 2016).

Resazurin (7-hydroxy-3 h-phenoxazin-3-one-10-oxide) is a cell-permeable redox indicator that has historically been used to monitor microbial contamination of milk (Feuillat et al. 1971). Indeed, resazurin, a blue and nonfluorescent dye, is metabolized within the bacterial cell and reduced into resorufin, a highly fluorescent pink compound that is released into the medium. Resorufin production is proportional to the amount of metabolically active cells and can be monitored by spectrometry (resazurin: 600 nm; resorufin: 570 nm) or by fluorometry ($\lambda_{\text{excitation}}$: 530-560 nm / $\lambda_{\text{emission}}$: 590 nm) (Pettit et al. 2005; Peeters et al. 2008; Dalecki et al. 2016). Since the early 2000s, resazurin has been increasingly used among the methods based on metabolic activity, because it offers many advantages (Doll et al. 2016; Azeredo et al. 2017): non-toxic for bacterial cells, solubility of resazurin and resorufin in water, visual monitoring, time-saving, high-throughput and inexpensive analysis, results correlated to CFU counts (possible calibration curves) and with a good sensitivity when using the fluorescence signal (Peeters et al. 2008; Rampersad 2012; Riss et al. 2013) or when used in a kinetic approach (Van den Driessche et al. 2014).

However, most methods developed to evaluate the viability of cells within biofilms are qualitative or semi-quantitative, and are hence used to assess the efficacy of anti-biofilm treatments by comparing results to a negative control assay (Stiefel et al. 2016). However, quantification of biofilm formatting bacteria by using a resazurin assay is still challenging. Indeed, (Sandberg et al. 2009) planktonic and biofilm forming cells of *Staphylococcus aureus* incubated with 20 μM resazurin during 20 min showed that the protocol provided a good screening assay in 96-well microtiter plates but that planktonic calibration curves were still not appropriate to quantify biofilm forming cells. Moreover, in literature, resazurin assays used for evaluating biocide effects are mainly based on the measurement of an endpoint applied on cell suspensions or biofilms and at a single cell concentration (Vandecandelaere et al. 2016). However, the linear range to quantify viable cells with such a method is narrow, which explains why (Van den Driessche et al. 2014) suggested to improve the protocol by using a kinetic approach, thereby increasing the range of bacterial concentrations up to 5 \log_{10} depending on the studied strains. Finally, depending on the pH conditions, resorufin released into the medium can be further reduced into dihydroresorufin, a colorless and nonfluorescent compound, leading to a transient pink fluorescent signal. This variability highlights the need to determine a more appropriate measurement of the endpoint time which is specific to each strain (Vandecandelaere et al. 2016). This chemical reduction can occur particularly in acidic

conditions, thereby introducing a bias when quantifying lactic acid bacteria for example, due to their inherent production of organic acids during growth (Jung et al. 2017). As a consequence, several studies have focused on optimizing the assay, especially by taking into account the fluorescence/absorbance signal as a function of time (Van den Driessche et al. 2014; Dalecki et al. 2016).

In this study, we first aimed at calibrating a resazurin assay to quantify suspensions of the lactic acid bacterium *Leuconostoc citreum*, and the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. The assay was then applied to mono-species surface-spread bacteria and biofilms grown on esters cellulose membranes for both strains. Finally, results were compared to conventional cell counts, in order to evaluate if the proposed protocol would enable to determine cell viability and to quantify bacterial cells under different physiological states.

2 Material and methods

2.1 Strains and culture conditions

Two bacterial strains used in this study were *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (ATCC 11449) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Stock cultures were made by inoculating 5 ml MRS (de Man Rogosa and Sharpe) broth with *L. citreum* and 5 ml LB (Luria Bertani) broth with *P. aeruginosa* by using a loopful of microorganisms from glycerol stocks (20% v/v) and by incubating both cultures overnight. *L. citreum* was routinely grown at 30°C while *P. aeruginosa* was grown at 37°C. Stock cultures were preserved at 4°C for a maximum of 4 weeks.

From these stock suspensions, different cultures were prepared to manage different physiological states.

Preliminary experiments showed that cultivation in TS medium was the only suitable condition which enabled growth of both studied bacteria (data not shown). As a consequence, planktonic cells were obtained by inoculating Trypticase Soy broth (TS) with 4% (v/v) of stock cultures, and by incubating them at 30°C. Growth kinetics were determined over 20 hours by measuring absorbance at 600 nm and pH was monitored. Exponential phase cells (EP) were harvested after 5 to 6h of incubation and stationary phase cells (SP) were obtained overnight.

Surface-spread bacteria (SSB) and 24-hour biofilms (B24 h) were obtained on ester cellulose membranes as previously described in (Marchal et al. 2012). Briefly, an overnight culture was deposited by filtering a calibrated suspension through Pall GN-6 Metrical® sterile membranes

(diameter 47 mm, pore size 0.45 μm) and the filtration membrane was then immediately placed on agar base media, MRS and LB for *L. citreum* and *P. aeruginosa*, respectively. This process hence gave calibrated surface-spread bacteria samples, and subsequent 24-h incubation allowed biofilm growth. Of note, *L. citreum* biofilms were also produced by adding 40 g l^{-1} sucrose in the culture medium which induced the production of extracellular glucans (Bounaix et al. 2010; Passerini et al. 2015). Each experiment was conducted at least in triplicate.

2.2 Resazurin assay calibration on exponential phase cells

Serial 10-fold dilutions in TS broth were achieved from exponential growth phase cell suspensions, in order to cover a range of cell concentrations between about 10^2 and 10^7 CFU ml^{-1} for both strains. Dilutions were then used for both conventional plating (CFU counts) and for the resazurin-based assay. For enumeration, 10 μl of serial diluted cells were transferred to TS agar plates in triplicate, and CFU were counted after 24 hours of incubation at 30°C. For the resazurin assay, 180 μl of each dilution were deposited into the wells of a 96-well microplate. A freshly prepared resazurin solution (Sigma-Aldrich 199303, 20 mmol l^{-1} in PBS) was filtered at 0.22 μm and 20 μl were added to each well reaching a final resazurin concentration of 2 mmol l^{-1} . Previous experiments showed that such a concentration did not present any inhibitory effect on the growth of *P. aeruginosa* and *L. citreum* growth (results not shown). Plates were then incubated for 20 hours at 30°C in the dark. For each tested suspension, an additional well containing only TS medium and resazurin reagent was used as a negative control. The fluorescence (λ_{ex} 560 nm / λ_{em} 590 nm) was measured every 10 minutes in a microplate reader (FLUOstar BMG Labtech).

Kinetic parameters were calculated using the Mars data software (BMG Labtech). For each assessed dilution, three specific times were calculated: the time needed to reach the maximum fluorescence value (TM), the time needed to reach the maximum rising slope (TMS) and the time needed to reach a threshold of 30 000 RFU (TT). Then, cell counts of each dilution were plotted against corresponding TMS, TT, and TM to obtain calibration curves.

2.3 Optimized assay application on cells in different physiological states

At first, exponential and stationary growth phases were diluted and resazurin assayed as previously described. Then, membranes supporting surface-spread bacteria and biofilms were placed in 1 ml of physiological saline sterile solution and vigorously mixed by vortexing 1 min,

which disrupted biofilms and released bacterial cells. Previous studies confirmed that less than 5% of bacterial cells remained on the membrane support (data not shown). The obtained bacterial suspensions were then sequentially diluted 10-fold in TS broth in order to cover a range of cell concentrations between 10^3 and 10^7 CFU ml⁻¹; dilutions were used for cell counts and the resazurin assay was then carried out as described previously. For all samples, the time needed to reach the maximum rising slope (TMS) was calculated for each dilution; and enumeration was plotted against TMS. The slopes from these linear correlations (expressed as Log (CFU ml⁻¹) h⁻¹) were used to compare the metabolic activity and the CFU cell counts in different physiological states: exponential phase (EP), stationary phase (SP), surface-spread bacteria (SSB) or 24-h biofilms (B24 h). A one-way ANOVA was conducted and the Dunns multiple comparison test was used to determine the level of significance ($p < 0.05$).

3 Results and discussion

3.1 Strain growth characteristics in TS medium

Bacterial growth was quite similar for both the strains in TS medium, with a generation time of 65 min and 85 min for *P. aeruginosa* and *L. citreum*, respectively. (Figure 1). An exponential growth phase was observed between 3 and 6 hours of incubation, and the related cells were sampled after 5 to 6 hours of culture. The stationary phase was reached after 10 hours of incubation for both strains. *P. aeruginosa* cultures did not expose significant variations of pH, on the other hand pH rapidly decreased from 7.0 to 5.5 after 10 hours of growth for *L. citreum*, and then slowly stabilized until 20 hours of culture, always remaining above 5.0.

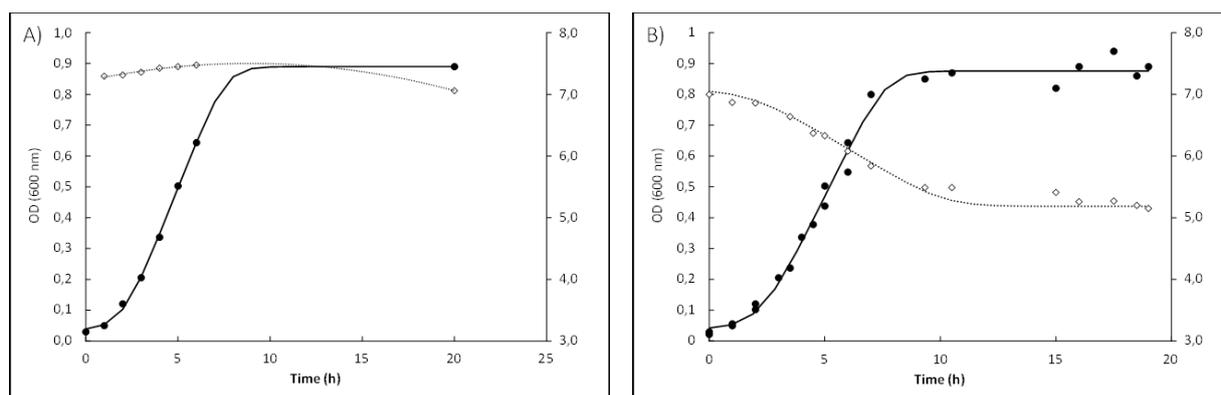


Figure 1: Growth (circular black symbol) and pH (diamond open symbol) kinetics of: A) *P. aeruginosa* and B) *L. citreum* in TS broth at 30°C

3.2 Kinetics and parameters for the resazurin assay – Exponential-phase cells calibration curve

Resazurin-based fluorescence was monitored over 20 hours for a range of bacterial cell concentrations between 10^2 and 10^7 CFU ml⁻¹ for both strains (Figure 2), and specific values of fluorescence were then determined at three distinct times: TMS (time to maximum rising slope), TT (time to threshold at 30 000 RFU) and TM (time to maximum RFU value). For *P. aeruginosa* (Figure 2A), fluorescent kinetic curves related to the different cell concentrations evolved in parallel, which indicates that the fluorescent signal and the cell load were well correlated. A lag phase with no fluorescent signal was systematically observed during the first hours of incubation: 10-hour lag for the highest cell concentration which increased with dilution of the culture until reaching the lowest concentration without any increase in fluorescence, even after 20 hours incubation. Such a delay to generate a fluorescent signal has already been reported for *P. aeruginosa*. Indeed, as early as 2009, the growth of different strains was compared (*E. coli*, *E. hirae*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus*) by using resazurin fluorescence activity and results showed that *P. aeruginosa* presented the longest delay to generate a fluorescent signal (Mariscal et al. 2009). Moreover, (Van den Driessche et al. 2014) measured the time needed to reach a fluorescent signal of 100000 RFU for four strains, with cell densities close to 10^8 CFU ml⁻¹, and showed that this threshold was reached within a few minutes for *S. aureus*, *B. cenocepacia* and *C. albicans*, and within 5 hours for *P. aeruginosa*. In addition, authors showed with success that CFU counts correlated well with the time needed to reach 100000 RFU and this for a range of cell concentrations going from 10^2 to 10^7 CFU ml⁻¹. This innovative view was convincing to hence further develop a resazurin assay based on a

dynamic approach as presently developed in this study. After the lag phase, the fluorescent signal increased exponentially until reaching the maximum RFU value, with a saturation of the signal under the present experimental conditions. As a consequence, the TM could not be calculated but TT and TMS were determined for all dilutions which kinetics showed that fluorescence reached a plateau.

For *L. citreum*, fluorescence kinetics showed four main phases: a lag-phase with a slow-increasing signal, an exponential phase reaching a maximum value, a decreasing-phase, and a second increase followed by a tailing effect. Moreover, for the four lowest concentrations, a shouldering effect appeared during the exponential phase. This suggests that such fluctuations in the fluorescent signal may be linked to the chemistry of resorufin and the acidification of the medium which are inherent to the growth of *L. citreum* (Figure 1), with pH values which decreased from 7.0 to 5.5 as mentioned previously. Indeed, during the exponential phase, the metabolic reduction of resazurin into the fluorescent resorufin might have been faster than the pH dependent chemical reduction of resorufin into non fluorescent dihydroresorufin, thus leading to an accumulation of resorufin and an increase of the fluorescent signal, as previously suggested by (Chen et al. 2015). On the other hand, the fluorescent signal might have decreased when the chemical reduction of resorufin exceeded the metabolic reduction of resazurin. Therefore, these fluorescence kinetics at different cell concentrations clearly show that with an endpoint approach and unknown cell concentrations, a unique fluorescent data would not have been able to quantify *L. citreum* cell suspensions. By using a dynamic approach to interpret the resazurin assay, the chemical reduction of resorufin was taken into account, and the three characteristic times could be determined for each kinetics (Figure 2B).

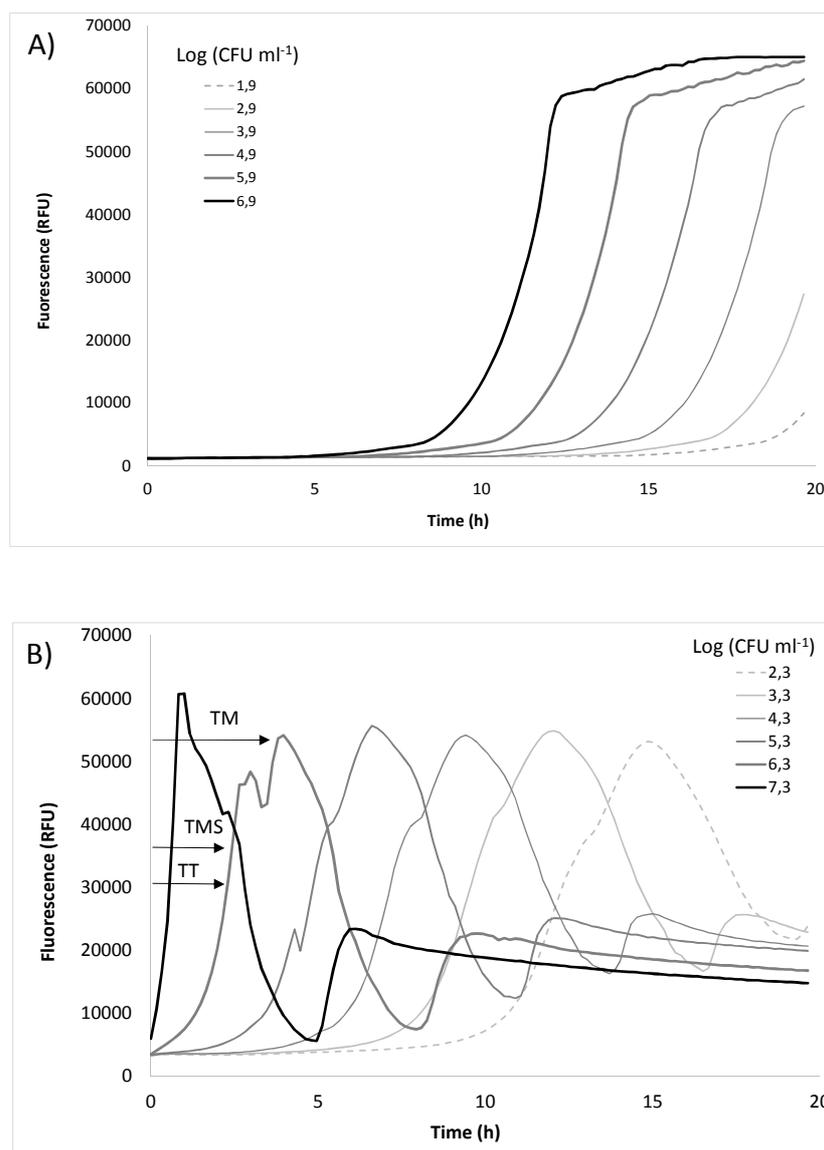


Figure 2: Fluorescence kinetics of resorufin for planktonic cells from A) *Pseudomonas aeruginosa* and B) *Leuconostoc citreum* in exponential phase state. The different curves (from dark lines to dotted lines) correspond to six different bacterial cell concentrations, indicated in the graph in log₁₀ CFU ml⁻¹. Characteristic parameters are represented on *L. citreum* graph: times needed to reach (i) the maximum fluorescence value (TM), (ii) the maximum rising slope (TMS) and (iii) a threshold of 30 000 RFU (TT).

Secondly, the reference times were plotted against CFU cell counts (Figure 3). For *P. aeruginosa* (Figure 3A), 5 dilutions could be used to calculate the times needed to reach a threshold or the maximum rising slope, TT and TMS respectively. Both TT and TMS were well correlated to the CFU counts ($r^2 > 0.97$). For *L. citreum*, the three characteristic times correlated well with the CFU cell counts ($r^2 > 0.98$) (Figure 3B). Determining TMS enabled to thoroughly consider the different metabolic reactions and their equilibria. This parameter was hence preferred to the time to threshold (TT) value hereafter.

Finally, the use of the TMS parameter applied on kinetics from different diluted cell suspensions sampled from the exponential phase of each strain allowed to define a wide range of calibration curves, from 10^3 to 10^7 CFU ml⁻¹ for both strains. Moreover, the use of TMS unlocked the technical constraint related to the quantification of bacterial suspensions in acidic conditions as reported by (Jung et al. 2017). Hopefully, future developments might now bring solutions to quantify cells in media which contain reducing compounds such as copper (Doll et al. 2016) or ascorbic acid (Natto et al. 2012).

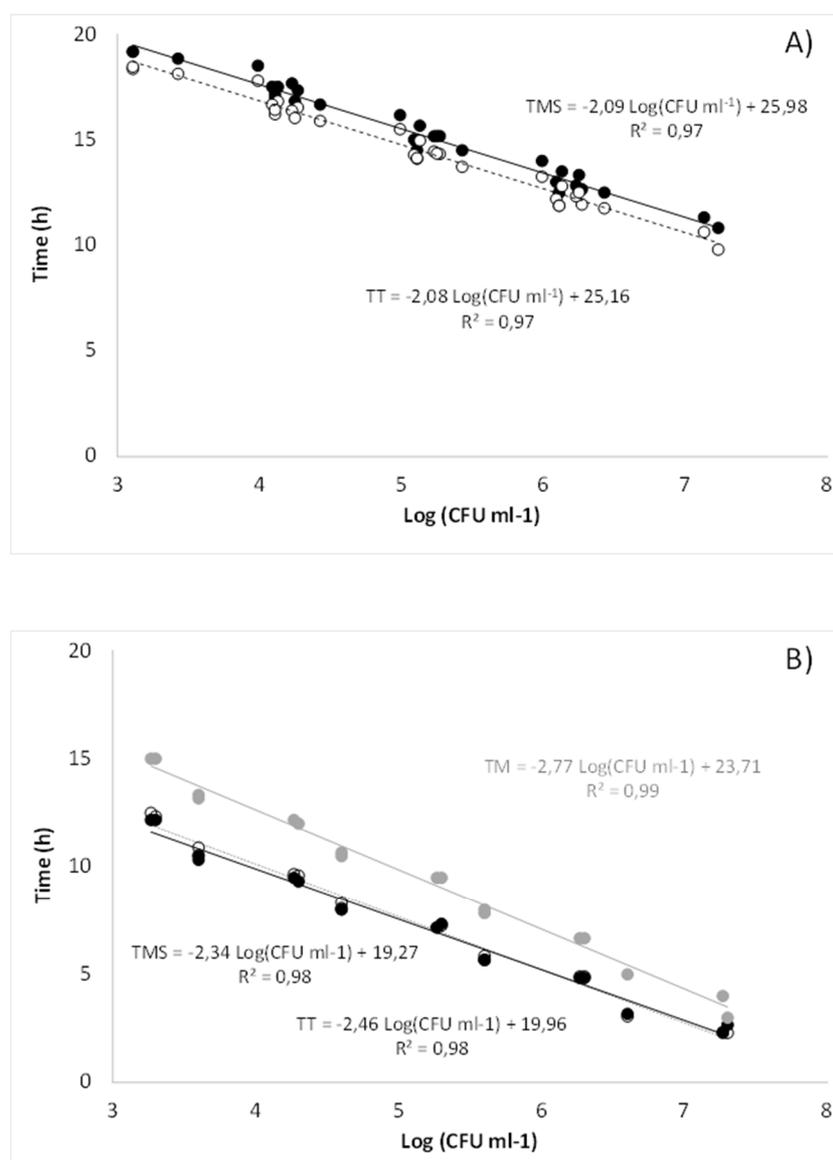


Figure 3: Calibration curves showing the relation between the different time parameters used (TM, TMS, and TT) and the number of CFU in log₁₀ (CFU ml⁻¹) of A) *P. aeruginosa* and B) *L. citreum*. Calibrations curve realized using (i) the time needed to have a fluorescence of 30 000 RFU (TT, open symbol), (ii) the time needed to reach the maximal fluorescence (TM, grey symbol) and (iii) the time needed to reach the maximal rising slope (TMS, black symbol).

3.3 Application of the assay on cells under different physiological states

The resazurin protocol was applied on both strains presenting different physiological states. For each cell suspension obtained from planktonic cultures, surface-spread bacteria or biofilms, serial dilutions were undertaken and the resazurin assay was applied. The time needed to reach the maximal rising slope was calculated for each dilution. A good correlation was systematically observed between the TMS and the CFU cell counts (r^2 always higher than 0.9) for cell concentrations between 10^3 and 10^7 CFU ml⁻¹ (data not shown), which is in agreement with the study of (Van den Driessche et al. 2014). Recently, a similar dynamic approach, using the time to reach the approximate half maximum fluorescence value (corresponding to the exponential resazurin conversion), was successful to distinguish in relative terms, untreated biofilms from gentamicin treated biofilms (Dalecki et al. 2016).

The slopes obtained from correlated data between cell counts and TMS were used to compare the metabolic activity under different physiologic states (Figure 4). For both strains, these correlation slopes showed that cells sampled in the stationary phase behaved similarly to cells in the exponential phase, while the metabolism of resazurin changed between surface-spread bacteria (SSB) and biofilms. For a given cell concentration of *L. citreum*, the TMS significantly increased for SBB and biofilms compared to planktonic cultures, thereby indicating a lower metabolic activity, while the contrary was observed for *P. aeruginosa*, with a slight decrease of the TMS for the SSB. These results are in agreement with (Sandberg et al. 2009) who showed that planktonic cell calibration curves were not suitable for quantifying viable cells in *Staphylococcus aureus* biofilms. However, in this present study, the vertical Y-intercepts of linear correlations between cell concentrations (CFU) and time to maximum slopes (TMS) obtained for SSB and biofilms, except B24S, were comparable to exponential phase cells (data not shown), i.e. the resazurin response was not effective in differentiating physiological states under high cell concentrations. On the other hand, the lower the cell suspension concentration, the greater the difference of resazurin response between cells in different states. This observation is in opposition to results presented by (Sandberg et al. 2009) who used an endpoint method and evidenced a difference between planktonic and biofilms cells only at high cell concentrations. An explanation to this divergence could be, that the inherent sampling step to recover cells from the membrane, in the case of SSB and biofilm cells, induced a physiological stress leading to an increase in the cell metabolism and hence the reduction of resazurin.

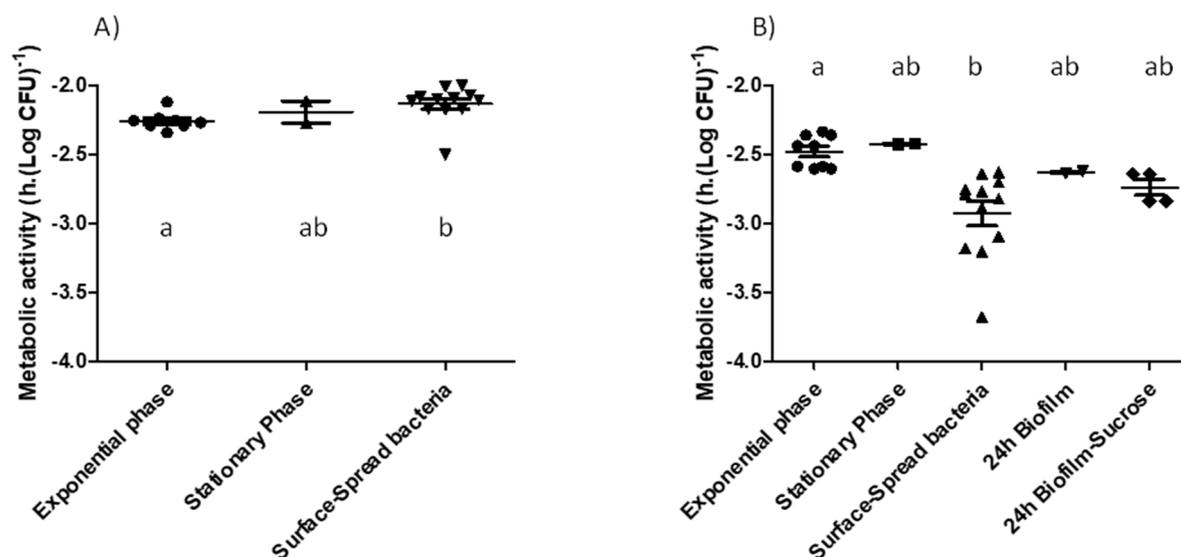


Figure 4: Slopes of linear correlations between times to max slope and CFU counts obtained from different physiological states of *Pseudomonas aeruginosa* (A) and *Leuconostoc citreum* (B) cells.

4 Conclusion

The resazurin assay is a fast, simple, sensitive, strain-specific, and economical method to assess bacterial viability, now commonly used to evaluate the viability of planktonic cell suspensions or biofilms after biocide treatments. The resazurin staining protocol proposed in the present study significantly improved the initial endpoint method in two ways: (i) it enabled the quantification of acidifying bacterial strains, such as lactic acid bacteria, by overcoming the loss of signal due to acidity; (ii) it gives the possibility to investigate a larger range of concentrations, from 10^3 to 10^7 CFU ml⁻¹ for the tested strains and conditions. These achievements were possible thanks to the use of (i) a high concentration of resazurin, (ii) a dynamic approach, by measuring the resorufin fluorescent signal over 20 hours and (iii) by determining the necessary time to reach the maximum rising slope (TMS). This extended incubation time can be seen as an inconvenient due to the delay of response, but in turn, it avoids preliminary time-consuming studies such as optimizing the incubation time. In these conditions, the assay can also be applied on different types of bacterial samples, independently of the cell concentration, metabolic activity, physiological state or pH for instance. Moreover, the present study confirmed that the resorufin fluorescent signal correlated well with CFU cell counts, and this independently on the physiological state of the cells or whether the samples went through prior preparation steps or not. The assay was sensitive enough to differentiate the metabolic

response of cells in different physiological state (surface-spread bacteria and 24-h biofilms vs exponential phase cells). Such results imply that, in the case of anti-bacterial screening assays, before correlating measured resazurin metabolic activity and CFU cell counts, a calibration curve will have to be established specifically for each physiological state of the sample (planktonic cultures or biofilms) and for each strain.

Acknowledgements

The authors wish to thank Alice Baldy for her technical help. This research was supported by the IUT A Paul Sabatier (Toulouse University), Auch and Gers Local Councils, and Occitanie Regional Council (grants n°14055695 and n°12050475). The authors also thank Monique Ras de Moncuit for proof-reading of the manuscript.

References

- Alonso B, Lucio J, Pérez-Granda MJ, Cruces R, Sánchez-Carrillo C, Bouza E, Guembe M (2016) Does biomass production correlate with metabolic activity in *Staphylococcus aureus*? *J Microbiol Methods* 131:110–112 . doi: 10.1016/j.mimet.2016.10.011
- Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z, Kačániová M, Knøchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 43:313–351 . doi: 10.1080/1040841X.2016.1208146
- Bounaix MS, Gabriel V, Robert H, Morel S, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C (2010) Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. *Int J Food Microbiol* 144:1–9 . doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.026
- Chen JL, Ortiz R, Xiao Y, Steele TWJ, Stuckey DC (2015) Rapid fluorescence-based measurement of toxicity in anaerobic digestion. *Water Res* 75:123–130 . doi: 10.1016/j.watres.2015.02.035
- Costerton JW and ZL (1995) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745 . doi: 10.1007/s00284-011-0034-y
- Dalecki AG, Crawford CL, Wolschendorf F (2016) Targeting Biofilm Associated *Staphylococcus aureus* Using Resazurin Based Drug-susceptibility Assay. *J Vis Exp* 1–6 . doi: 10.3791/53925
- Doll K, Jongstaphongpun KL, Stumpp NS, Winkel A, Stiesch M (2016) Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J Microbiol Methods* 130:61–68 . doi: 10.1016/j.mimet.2016.07.016
- Feuillat M, Perrot C, Vieudrin C, Feuillat M, Perrot C, Vieudrin C (1971) Essai d'amélioration du test à la résazurine pour le contrôle de la qualité bactériologique du lait. *51:545–558* . doi: 10.1051/lait:197150827

- Jung MY, Lee J, Park B, Hwang H, Sohn S-O, Lee SH, Lim HI, Park HW, Lee J-H (2017) Applicability of a colorimetric method for evaluation of lactic acid bacteria with probiotic properties. *Food Microbiol* 64:33–38 . doi: 10.1016/J.FM.2016.12.008
- Marchal F, Robert H, Merbahi N, Yousfi M, Romain CE, Eichwald O (2012) Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. *J Phys D Appl Phys* 45:345202 . doi: 10.1088/0022-3727/45/34/345202
- Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Carnero-Varo M, Fernandez-Crehuet J (2009) Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:773–783 . doi: 10.1007/s00253-009-1879-x
- Natto MJ, Savioli F, Quashie NB, Dardonville C, Rodenko B, de Koning HP (2012) Validation of novel fluorescence assays for the routine screening of drug susceptibilities of *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother* 67:933–943 . doi: 10.1093/jac/dkr572
- Passerini D, Vuillemin M, Ufarté L, Morel S, Loux V, Fontagné-Faucher C, Monsan P, Remaud-Siméon M, Moulis C (2015) Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 - Identification of three novel α -transglucosylases. *FEBS J* 282:2115–2130 . doi: 10.1111/febs.13261
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72:157–165 . doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010
- Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, Franks KS, Horton ML (2005) Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2612–2617 . doi: 10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005
- Rampersad SN (2012) Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)* 12:12347–12360 . doi: 10.3390/s120912347
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (2013) Cell Viability Assays. *Assay Guid Man [Internet]* 114:785–796 . doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006
- Sandberg ME, Schellmann D, Brunhofer G, Erker T, Busygin I, Leino R, Vuorela PM, Fallarero A (2009) Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J Microbiol Methods* 78:104–106 . doi: 10.1016/j.mimet.2009.04.014
- Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K, Ren Q (2016) Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:4135–4145 . doi: 10.1007/s00253-016-7396-9
- Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T (2014) Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J Microbiol Methods* 98:31–34 . doi: 10.1016/j.mimet.2013.12.011
- Vandecandelaere I, Van Acker H, Coenye T (2016) A microplate-based system as in vitro model of biofilm growth and quantification. In: *Bacterial persistence: methods and protocols*. Humana Press, New York, NY, pp 53–66

Application de la méthode développée à l'évaluation de l'effet biocide de la LED UV-C

L'essai à la résazurine développé a été appliqué en parallèle du dénombrement pour évaluer l'effet de la LED UV-C sur des cellules déposées (SSB) de *P. aeruginosa* à $8,2 \pm 0,28 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$ et de *L. citreum* à deux concentrations ($7,8 \pm 0,02 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$ et $8,8 \pm 0,05 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$) qui dans ce dernier cas résultait en un effet biocide différent d'environ $1 \log_{10}$ (p.193).

La Figure 81 représente les cinétiques d'inactivation de cellules SSB de *L. citreum* (A) et de *P. aeruginosa* (B) traitées avec différentes doses d'UV-C (660, 1320 et 2640 mJ.cm^{-2}). Les données en traits pleins et symboles pleins représentent les résultats obtenus avec la méthode de dénombrement sur boîte, alors que les résultats obtenus avec la méthode métabolique résazurine sont en traits en pointillés et symboles ouverts.

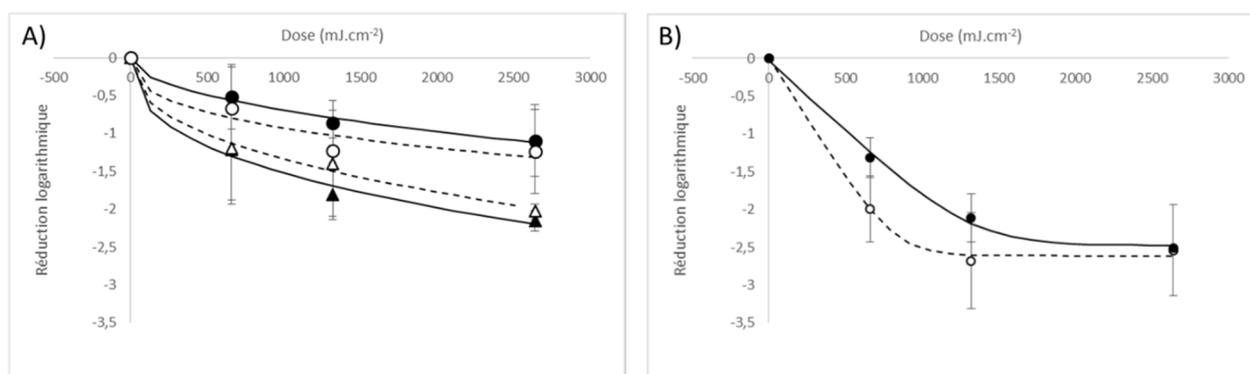


Figure 81: Réduction de la viabilité estimée par dénombrement (symboles et traits pleins) ou essai à la résazurine (symboles ouverts et pointillés) après traitement LED UV-C de cellules déposées. A) *L. citreum* à 2 concentrations (triangles : $7,8 \pm 0,02 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$ et ronds : $8,8 \pm 0,05 \log_{10} \text{ UFC.cm}^{-2}$ et B) *P. aeruginosa*. Les modèles représentés correspondent à une régression de Weibull pour *L. citreum* et une régression « linear log + tail » pour *P. aeruginosa* (n=3)

Pour *L. citreum*, la réduction de la viabilité suite au traitement LED UV-C estimée par dénombrement sur boîte ou essai à la résazurine est comparable aux différents temps de traitements et pour les deux concentrations cellulaires testées.

Dans le cas de la souche de *P. aeruginosa*, la réduction de viabilité semble plus rapide avec la méthode résazurine qu'avec le dénombrement sur boîte, les différences ne sont cependant pas

significatives. Cette réponse pourrait être notamment expliquée par une réponse au stress UV, impactant l'activité métabolique dans le cas de cette souche.

En conclusion, la quantification avec le marqueur résazurine développée permet d'étudier de façon fiable les résultats de traitement biocide de cellules déposées sur membrane (ou SSB).

Conclusions générales et perspectives

La difficulté d'inactivation des biofilms bactériens par des traitements biocides chimiques ainsi que les considérations environnementales ont conduit à l'émergence de nouveaux types de traitements. Ces travaux de thèse ont ainsi été consacrés en grande partie à l'évaluation des capacités biocides sur des biofilms bactériens modèles de deux types de traitements physiques présentés comme novateurs et durables : un **dispositif jet de plasma froid à la pression atmosphérique** et un **dispositif comportant une LED émettant dans les UV-C à 280 nm**.

La prise en compte des paramètres biologiques a été une préoccupation majeure lors de ces travaux : étude de biofilms calibrés et reproductibles, prise en compte de la densité bactérienne et de la composition de la matrice.

Pour répondre à ces objectifs, une partie de ces travaux de thèse a ainsi consisté en des aspects de développement méthodologique, et le **premier objectif de l'étude a été de développer une méthode de formation de biofilms bactériens modèles, calibrés en termes de densité cellulaire** des biofilms sur lesquels seront appliqués les traitements. Un autre aspect a concerné le **développement de méthodes d'étude de la viabilité cellulaire**, en complément de la cultivabilité classiquement utilisée dans le cadre des études sur l'inactivation des biofilms.

Formation de biofilms bactériens modèles calibrés et reproductibles

Le premier objectif de ces travaux de thèse a ainsi été la **mise au point d'une méthode de formation de biofilms bactériens modèles à l'interface solide-air (Chapitre I)**.

Le choix s'est porté sur des biofilms de surface, formés sur des membranes poreuses, compatibles avec chacun des deux dispositifs de traitements, et permettant le développement de biofilms pour les deux types de bactéries modèles retenues pour leurs différences en termes de propriétés pariétale et matricielle : *P. aeruginosa* ATCC 15442 (Gram-) et *L. citreum* NRRL B-1299 (Gram+). La souche de *P. aeruginosa*, non mucoïde, a été retenue initialement du fait de son utilisation comme souche de référence dans la norme européenne NF EN 1040 d'évaluation de l'activité bactéricide, et dans la continuité d'autres travaux réalisés au laboratoire (Randrianjatovo et al. 2015; Randrianjatovo-Gbalou 2016). Le choix de la souche de *L. citreum* a reposé sur le fait qu'elle présente l'avantage de produire une matrice riche en glucanes, inductible par simple ajout de saccharose au milieu de culture. De plus, là encore, des travaux antérieurs du laboratoire avaient porté sur la production de ce type d'exopolysaccharides chez différentes bactéries lactiques (Bounaix 2010; Amari 2012).

Le domaine d'application des plasmas froids pour la décontamination/stérilisation de surface a conduit à choisir des biofilms modèles aériens, plus proches de leur domaine d'application, plutôt que des biofilms immergés, même si ces derniers sont utilisés dans la grande majorité des autres travaux. Ce type de biofilms est donc innovant pour l'étude des plasmas froids. On peut d'ailleurs souligner leur utilisation récente pour l'évaluation de dispositifs LED UV-C dans des travaux récents (Argyraki et al. 2017).

Ainsi, la formation des biofilms a été réalisée par filtration de suspensions bactériennes préalablement calibrées sur des membranes perméables d'esters de cellulose, de façon à obtenir une densité cellulaire choisie dans les biofilms ; les membranes sont ensuite déposées à la surface d'un milieu de culture bactérien permettant le développement du biofilm. Nous avons ici utilisé des biofilms obtenus après 24h d'incubation et avec une concentration finale cible de 10^8 CFU.cm⁻².

Cette méthodologie permet de plus d'éviter toute étape de manipulation du biofilm avant de réaliser le traitement, comme cela est nécessaire dans le cas fréquent de biofilms formés sur des supports immergés, nécessitant un transfert du biofilm avant traitement et pouvant entraîner une perte d'intégrité du biofilm. De plus, le traitement en lui-même se fait dans des conditions où le biofilm est déposé sur le milieu gélosé : il reste donc en conditions hydratées, ce qui est un critère important notamment pour le traitement plasma qui peut conduire à assécher plus ou moins fortement l'échantillon. Enfin, l'utilisation de biofilms aériens sur membrane permet de réaliser des analyses *in situ* (FTIR, MEB) après simple déshydratation des échantillons traités ou non.

Dans la majorité des études de l'effet des plasmas froids, le rôle protecteur de la matrice est envisagé en comparant des biofilms avec des cellules planctoniques, en phase exponentielle ou stationnaire de croissance, déposées le plus souvent sur une lame de verre. Ici, le choix a été fait de déposer des cellules en phase stationnaire de croissance également sur membrane d'esters de cellulose (SSB, *Surface Spread Bacteria*), de façon à limiter le plus possible les différences avec la modalité biofilm. Ce type de 'témoin' a permis également d'évaluer l'impact de la densité cellulaire dans la réponse au traitement.

Une **caractérisation des biofilms** formés dans les conditions définies a été réalisée en privilégiant des **approches *in situ*** (masse sèche, MEB, FTIR, CLSM). Cette caractérisation a

permis de valider expérimentalement que les trois types de biofilms ainsi formés (de densité cellulaire équivalente) ont des caractéristiques différentes et présentent des matrices contrastées, et a pleinement validé le choix initial des souches.

P. aeruginosa ATCC 15442 forme des biofilms avec une matrice complexe, comprenant à la fois des protéines, des polysaccharides et également de l'ADNe. La composante polysaccharidique de cette souche non mucoïde est relativement faible et est essentiellement associée aux cellules. Ainsi, les analyses en ATR-FTIR et l'utilisation du ratio AmII/Polysaccharides indiquent une prédominance de protéines par rapport aux polysaccharides. Ces résultats ont ainsi confirmé les informations obtenues sur des biofilms immergés de cette même souche lors de travaux antérieurs du laboratoire indiquant la diversité des composés matriciels présents, et notamment la présence abondante de protéines extracellulaires et d'ADNe (Randrianjatovo et al. 2015). Ces résultats fournissent également des renseignements pour cette souche qui, malgré son utilisation comme référence pour la détermination de l'activité bactéricide de produits antiseptiques ou désinfectants chimiques, est très peu décrite sur le plan matriciel sous la forme biofilm.

Les biofilms de *L. citreum* formés sur milieu MRS comportent, quant à eux peu d'éléments matriciels, d'après les observations macroscopiques et microscopiques (MEB). Les données de l'analyse en ATR-FTIR semblent indiquer une teneur équivalente du biofilm en protéines et en polysaccharides. Enfin, lorsque cette souche est cultivée en milieu MRS supplémenté en saccharose, comme attendu, les biofilms présentent un aspect macro- et microscopique fort différent, avec une composante matricielle importante (masse sèche 4 fois supérieure pour une même densité cellulaire). La richesse du biofilm en glucanes extracellulaires a été confirmée lors des analyses en spectroscopie infrarouge : l'empreinte spectrale de ces biofilms dans la zone polysaccharidique est similaire à celle de la fraction glucanes extracellulaires produite par cette même souche en condition planctonique, et le ratio AmII/PS très faible.

Méthode d'analyses de la viabilité des cellules

La technique classique d'évaluation de la population bactérienne de biofilms consiste à réaliser des dénombrements en milieu gélosé, de composition adaptée au micro-organisme étudié. Cette méthodologie, qui évalue la population bactérienne en CFU.mL⁻¹ ou CFU.g⁻¹, est utilisée historiquement pour définir l'efficacité de tout traitement antimicrobien, ce pour quoi elle a

été retenue dans ce travail (**chapitres II et III**). Cependant, plusieurs auteurs ont évoqué la nécessité de considérer la totalité des cellules viables en prenant en compte notamment la fraction potentielle de la population bactérienne sous forme viable mais non cultivable (VNBC), aussi bien après traitement par plasma froid (Flynn et al. 2015; Brelles-Mariño 2016) que par UV-C (lampe germicide) (Zhang et al. 2015). En effet, cette fraction VBNC peut être présente naturellement dans le biofilm du fait d'une hétérogénéité phénotypique et/ou induite par le traitement biocide utilisé. Or, ce type de cellules, qui ont un système membranaire intègre et un métabolisme cellulaire ralenti, peut, dans certaines conditions, se développer et contribuer à la reformation du biofilm. Ainsi, la mise en œuvre d'outils d'analyse permettant d'avoir accès à la viabilité des cellules au sein d'un biofilm, en complément de la cultivabilité, nous a paru nécessaire pour étudier de façon plus approfondie l'efficacité des traitements.

La **méthode moléculaire de viabilité-qPCR (ou v-qPCR)** a été expérimentée en premier lieu en ce sens (**Chapitre IV -1**). Cette méthode est décrite comme permettant de quantifier les cellules bactériennes viables (cultivables et non cultivables) en se basant sur l'intégrité membranaire des cellules. Pour différencier les cellules lésées, des agents intercalants (EMA ou PMA) sont utilisés pour inhiber l'amplification de l'ADN. Lors des essais de développement de la méthode sur des suspensions bactériennes, des conditions opératoires pour l'étape proprement dite de qPCR ont pu être définies et améliorées par rapport à la littérature, avec notamment la définition d'amorces spécifiques pour l'amplification de l'ADN de *L. citreum*. De plus, il a été montré que le PMA et l'EMA sont bien capables de se lier à l'ADN de cellules mortes et d'inhiber son amplification par qPCR. Cependant, cette liaison, dans les conditions utilisées, était partielle et ne permettait pas de modifier l'ensemble de l'ADN disponible. Ce phénomène pourrait ainsi générer une surestimation des cellules viables. Ce même type d'observation a déjà été retrouvé dans la littérature (Løvdaal et al. 2011; Slimani et al. 2012; Taylor et al. 2014) et pose encore un réel problème dans l'utilisation de cette technique. Ainsi, la définition d'un protocole pour obtenir une calibration de la méthode sur des cellules en phase exponentielle demandait encore un travail important et chronophage d'optimisation de différentes variables, comme par exemple la durée d'incubation, la concentration du PMA et de l'EMA, ou encore la définition de nouvelles amorces. Malgré un travail important de mise au point déjà réalisé, le choix a donc été fait d'abandonner cette méthode, avant même son application sur des cellules bactériennes issues de biofilms.

Une seconde méthode a donc ensuite été envisagée, la **méthode métabolique à la résazurine**, basée sur la réduction enzymatique de la résazurine en résorufine fluorescente lorsque les cellules sont métaboliquement actives (**Chapitre IV-2**). La résazurine est de plus en plus utilisée dans les essais à haut débit d'évaluation d'activité biocide, permettant une approche relative de l'effet par rapport à un témoin. Les protocoles utilisés sont réalisés généralement en point final, et le résultat est exprimé en pourcentage de réduction de la fluorescence, comme dans le protocole proposé par (Vandecandelaere et al. 2016).

Les modifications apportées à cet essai dans ce travail de thèse sont : (i) l'utilisation d'une concentration élevée en résazurine (2 mmol.L^{-1}); (ii) l'établissement d'une cinétique d'apparition de la fluorescence sur 20 heures ; (iii) l'exploitation du temps nécessaire pour atteindre le point d'inflexion du signal fluorescent (*time to max rising slope*, TMS).

Ainsi, la calibration de l'essai à la résazurine réalisée en microplaques sur des cellules en phase exponentielle de croissance a bien permis de corréliser la cultivabilité avec l'activité métabolique, et cela même dans le cas de *L. citreum* qui entraîne une acidification importante du milieu de culture. En effet, cette acidification conduit à une réduction chimique de la résorufine et une perte du signal fluorescent qui avait conduit certains auteurs à conclure que la méthode à la résazurine, utilisée en point final, n'était pas adaptée dans le cas de bactéries lactiques (Jung et al. 2017). Le protocole proposé constitue également une amélioration quantitative de la méthode dynamique proposée par Dalecki et collaborateurs dans laquelle le temps de retard dans la métabolisation de la résazurine, lié à un effet biocide, était utilisé pour donner une valeur relative de réduction de la viabilité (Dalecki et al. 2016).

Au final, la quantification de la viabilité cellulaire a été possible pour chacune des deux souches sur une large gamme de concentrations de cellules planctoniques, en phase exponentielle de croissance : de 10^3 à 10^7 CFU.mL⁻¹ pour les deux souches.

L'utilisation du protocole sur des cellules planctoniques (en phase exponentielle ou stationnaire) et des cellules sur membranes (SSB ou biofilms) a bien montré son applicabilité sur les différents types d'échantillons étudiés. Cependant, il a également révélé le besoin **d'établir des droites de calibration propres à chaque état physiologique ou chaque condition opératoire**. En effet, une variabilité des droites obtenues pourrait être liée à des niveaux d'activité métabolique différents en fonction de l'état physiologique des cellules et/ou de l'effet des étapes de récupération et de préparation des échantillons dans le cas des SSB et des

biofilms. Les résultats obtenus rejoignent sur ce plan les recommandations également données par d'autres auteurs sur le besoin de calibration spécifique au mode biofilm (Sandberg et al. 2009).

Développée tardivement, la méthode métabolique à la résazurine n'a pu être exploitée dans le cadre de ces travaux de thèse que pour le traitement de cellules déposées (SSB) avec le dispositif LED UV-C. Dans ce cas, le même niveau de réduction de la population bactérienne que celui déterminé par dénombrement a été observé, aussi bien pour *P. aeruginosa* que *L. citreum*. Cette méthode prometteuse pourra donc être mise en œuvre ultérieurement dans le cas du traitement des biofilms par les deux types de dispositifs.

D'une manière plus générale, le protocole proposé présente des perspectives pour une application **d'évaluation d'effet biocide haut débit** sur des biofilms telle qu'elle est généralement appliquée en microplaque 96 puits, puisqu'il permet de quantifier directement dans les puits la réduction logarithmique de la population bactérienne.

Effet des traitements physiques sur les biofilms bactériens modèles

Le dispositif plasma est un **jet de plasma froid à la pression atmosphérique auto-soufflé par l'air ambiant** qui a été développé et caractérisé par l'équipe PRHE du laboratoire LAPLACE. Il produit des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, mais pas de rayonnement dans les UV-C. L'activité biocide de ce système peut donc être uniquement imputée à un stress oxydatif et nitrosatif (RNOS), contrairement à de nombreux autres dispositifs plasma utilisés dans la littérature et qui génèrent à la fois un stress oxydatif et une irradiation UV. Dans le cas du traitement par les UV-C, il s'agit également d'un prototype, comportant une **lampe LED UV-C émettant à 280 nm**. L'activité biocide peut être dans ce cas imputée à la fois à des photo-dommages directement sur l'ADN, mais aussi pour une part à la production de ROS qui entraîne des dommages indirects à l'ADN ainsi qu'aux protéines.

Tous les travaux dans le domaine des plasmas froids, et notamment les plus récents parus lors de ces travaux de thèse, ainsi que ceux plus rares dans le domaine des traitements par LED UV-C, mentionnent une « implication de la matrice » dans le plus faible niveau d'inactivation des biofilms bactériens par rapport aux cellules planctoniques. Cependant, cette mise en évidence sur le plan expérimental est encore à établir. Les expérimentations réalisées au cours de ces travaux ont eu pour but d'apporter de nouveaux éléments sur ce plan, en contrôlant les

composantes cellulaire et matricielle, en quantité et en qualité et en limitant les variabilités expérimentales entre les différentes modalités.

Les résultats obtenus dans le cas des **cellules déposées sur membrane (SSB)** ont bien permis de démontrer une efficacité biocide des deux dispositifs, corrélée avec la durée d'exposition, et ceci pour les deux souches étudiées. L'effet maximal de réduction de la population bactérienne était de l'ordre de $2 \log_{10}$ après 20 min de traitement, et les cinétiques de réduction présentaient des allures biphasiques, conformément à ce qui est généralement décrit dans la littérature. Malgré des caractéristiques morphologiques et métaboliques différentes, les deux souches semblaient donc avoir le même niveau de sensibilité aux traitements appliqués.

Dans le cas du traitement LED UV-C seulement, l'**effet de la densité cellulaire** a pu être évalué pour les SSB et a mis en évidence des résultats différents suivant la souche. En effet, pour *P. aeruginosa*, le niveau de réduction de la population bactérienne était équivalent et proche de $2 \log_{10}$, quelle que soit la concentration cellulaire sur la gamme évaluée, tandis que pour *L. citreum*, un effet seuil a été observé, avec une diminution de moitié de l'efficacité de traitement à la plus forte densité cellulaire.

En ce qui concerne l'**action sur les biofilms**, les niveaux d'inactivation obtenus ont été beaucoup plus faibles.

Dans le cas du traitement **plasma**, aucun effet biocide n'a été observé pour les biofilms de *P. aeruginosa* et ceux de *L. citreum* comportant une matrice riche en glucanes. Seule une réduction de la population bactérienne a pu être observée dans le cas des biofilms de *L. citreum*, ceux dont la biomasse est la plus faible, avec une réduction significative visible seulement après 20 min de traitement et n'atteignant que $1,5 \log_{10}$. La comparaison entre les deux types de biofilms de *L. citreum*, de densité cellulaire équivalente, nous a ainsi permis de suggérer un rôle de protection des glucanes extracellulaires vis-à-vis du stress oxydatif induit par le traitement.

Dans le cas du traitement **avec la LED UV-C**, l'effet protecteur de la matrice a été mis en évidence seulement dans le cas des biofilms de *P. aeruginosa*. En effet, pour *L. citreum*, l'inactivation était similaire pour les deux types de biofilms (de l'ordre de $1 \log_{10}$), correspondant également à la réduction observée pour les SSB à la même densité cellulaire. Pour cette souche, ce dernier critère semblait donc prépondérant dans la réponse au

traitement LED. En revanche, pour *P. aeruginosa*, l'inactivation des cellules du biofilm était moindre que celle des SSB, déposée à une même densité cellulaire, attestant le rôle protecteur de la matrice. Cette observation a pu être mise en relation avec la richesse de la matrice en ADNe et en protéines qui absorbent une partie du rayonnement à cette longueur d'onde.

Par ailleurs, pour les deux types de traitement, les **analyses infrarouges** ATR-FTIR et la comparaison des empreintes spectrales obtenues avant et après traitement de 20 min tendent à mettre en évidence une modification au niveau de la fraction protéique des biofilms, même en dehors de tout effet biocide sur la population bactérienne (biofilms de *P. aeruginosa* traités par jet de plasma froid).

Au final donc, les travaux réalisés ont permis de souligner **l'importance de caractériser la composition matricielle et de contrôler le paramètre de densité cellulaire** pour pouvoir évaluer au mieux ensuite les effets des traitements mis en œuvre.

L'ensemble des interprétations de ce travail a été réalisé sur la base d'une analyse approfondie de la matrice extracellulaire, tandis que la réponse cellulaire a été appréhendée essentiellement au travers de la cultivabilité. Cependant, il est évident que la plus ou moins grande sensibilité des biofilms observée ne peut pas être imputée seulement à la différence de composition matricielle. En effet, les caractéristiques des deux souches dans leurs capacités de réparation des photo-dommages induits par l'irradiation UV et d'adaptation face à un stress oxydatif rentrent également en ligne de compte.

Perspectives

Grâce aux outils développés dans ce travail, il serait maintenant intéressant de pouvoir aller plus loin dans la **compréhension du rôle de la matrice dans la réponse aux traitements**. Pour cela, plusieurs approches pourraient être envisagées à plus ou moins long terme : mettre en œuvre de nouveaux outils analytiques, se placer dans des conditions plus favorables à l'évaluation des effets, ou encore simplifier les dispositifs modèles d'étude.

En ce qui concerne les outils analytiques, dans ce travail, **l'analyse infrarouge** a été limitée à une analyse globale pour comparer la signature spectrale des biofilms avant et après traitement. Sur le plan semi-quantitatif, seul le critère d'un ratio Amide II/ Polysaccharide a été

exploité, comme cela a été proposé par d'autres auteurs (Khan et al. 2016; Tareb et al. 2017), mais une exploitation plus poussée des spectres FTIR-ATR pourrait être réalisée. Par exemple, l'utilisation de la dérivation des spectres pourrait permettre d'augmenter la sélectivité et d'améliorer la discrimination des pics, afin d'aller vers une identification plus poussée des modifications engendrées par le traitement appliqué (Ghimire et al. 2017; Soler-arango et al. 2019).

De plus, l'observation en **microscopie confocale à balayage laser** après traitement devrait permettre d'ajouter une dimension spatiale à l'étude des effets du traitement tant sur le plan matriciel que cellulaire. En effet, certains auteurs ont montré une réduction de l'épaisseur d'un biofilm *P. aeruginosa* après traitement par plasma froid (Ziuzina et al. 2015). L'utilisation de **marqueurs spécifiques des protéines et de l'ADN** devrait notamment permettre de confirmer les effets observés sur la fraction protéique par spectroscopie infra-rouge, et d'évaluer des modifications éventuelles sur la fraction ADNe. Ces éléments qualitatifs sur la matrice pourraient être complétés par des éléments sur les cellules, grâce au **kit Live & Dead®**. Ce dernier marquage apporterait des informations supplémentaires sur la répartition dans l'espace des cellules – intègres ou non - au sein du biofilm.

Un autre type d'approche envisageable est celle de la **microscopie à force atomique (AFM)** qui a permis de mettre en évidence une désorganisation et une perte de structure tridimensionnelle dans le cas d'un biofilm de *P. aeruginosa* (Vandervoort and Brelles-Mariño 2014).

Pour favoriser l'évaluation des effets et faciliter leur observation, des améliorations pourraient porter tant au niveau des systèmes biologiques que des systèmes physiques.

En ce qui concerne les biofilms, un premier aspect serait de travailler à une **plus faible densité cellulaire**. En effet, les traitements ont été appliqués à des densités assez élevées (10^8 CFU.cm⁻²) en comparaison d'autres études du domaine. Ce facteur a pu contribuer largement à limiter le niveau d'inactivation observé. De plus, la membrane d'esters de cellulose utilisée pour former les biofilms à une certaine porosité et une certaine rugosité de surface : des cellules bactériennes peuvent donc être protégées physiquement par ce support et se trouver inaccessibles au traitement. Cette hypothèse a notamment été évoquée lors du traitement aux UV-C de bactéries déposées en surface de baies de fruits (Butot et al. 2018). Cet élément fait le lien avec **l'importance de la zone réellement atteinte par le traitement**. Le fait de considérer

que l'ensemble des bactéries présentes sur le coupon de membrane de 1,5 cm² peut bien être altéré par le traitement a reposé sur l'évaluation du diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne dans le cas de bactéries déposées en nappe sur milieu gélosé. Ce diamètre, supérieur à 2 cm après traitement par jet de plasma froid ou LED UV-C, a peut-être été surestimé par rapport à la zone réellement impactée lors des traitements des biofilms ou des SSB, ce qui a pu conduire à une sous-évaluation du niveau global de réduction de la population bactérienne.

De plus, lors de cette étude, nous avons choisi de fixer dès le départ un ensemble de paramètres dans les conditions opératoires, y compris une même distance entre la source et la cible, pour chacun des dispositifs, de façon à ce que le seul paramètre variable entre les différents essais soit le temps de traitement. Ce choix a pu également contribuer à un faible niveau d'efficacité. Une réduction de la distance entre la pointe du jet de plasma ou la LED et l'échantillon pourrait donc être envisagée.

Une autre amélioration consisterait en l'utilisation de dispositifs mobiles au-dessus de toute la surface à traiter ou de dispositifs multi-sources : plusieurs pointes dans le cas du jet de plasma ou plusieurs LED UV-C comme cela a été proposé dans des travaux récents (Akgün and Ünlütürk 2017; Kim et al. 2017).

Par ailleurs, la mise en évidence du rôle protecteur de la matrice du biofilm pourrait être évaluée en **comparant le degré de sensibilité d'un biofilm après une déstructuration enzymatique**. Cette démarche a, d'ailleurs, été très récemment employée en appliquant une DNase sur des biofilms de *P. aeruginosa* avant un traitement plasma (Soler-arango et al. 2019). Ce type d'approche permettrait ainsi de caractériser l'implication de certains composés matriciels dans la plus ou moins grande sensibilité du biofilm au traitement.

Une autre alternative serait l'utilisation de mutants altérés dans la production de composés matriciels spécifiques, comme il en existe pour certaines souches de *P. aeruginosa* (PA14 et PAO1).

En ce qui concerne la simplification des dispositifs modèles, au vu de l'importance des paramètres de composition du biofilm (densité cellulaire, nature et quantité de la matrice), une approche nouvelle pourrait être l'utilisation de biofilms 'artificiels' obtenus par mélange de cellules bactériennes de densité contrôlée et d'un ou plusieurs polymères spécifiques. Ce type d'approche n'a pour l'instant été décrit que dans les actes d'un congrès (Gilmore 2015),

montrant une réduction de l'effet biocide d'un plasma froid sur des cellules planctoniques de *P. aeruginosa* après ajout d'alginate ou d'ADN.

En ce qui concerne les dispositifs de traitement, le système LED UV-C est relativement simple et peu de simplifications peuvent être apportées. En revanche, pour le jet de plasma, le dispositif est plus complexe. Il serait possible d'envisager l'utilisation d'eau (ou du milieu de culture) activée au plasma (respectivement PAW ou PAM) comme cela a été décrit dans des travaux portant sur des applications en cancérologie (Judée et al. 2016) et pour le traitement de produits alimentaires (Ma et al. 2015). Outre une simplification du traitement, ceci permettrait d'envisager une analyse qualitative et quantitative des espèces actives présentes dans la solution de traitement, et qui entrent donc en interaction avec le biofilm.

Pour conclure, ces expérimentations menées à la fois avec deux types de dispositif physique de traitement, et deux souches bactériennes (à la fois sous forme de biofilm et de cellules déposées) ont contribué à réaliser une analyse de type exploratoire. De nombreux points restent à approfondir afin de mieux comprendre les interactions entre ces modes de traitement et la matrice des biofilms. Par ailleurs, la réponse cellulaire n'a pas été abordée dans ce travail, et demanderait à être également étudiée.

Toutefois, ce travail a confirmé le réel besoin de contrôler et décrire les paramètres expérimentaux, aussi bien pour les systèmes physiques que pour les systèmes biologiques, ainsi que la nécessité d'un travail pluridisciplinaire en étroite collaboration entre physiciens et microbiologistes. En effet, la très grande hétérogénéité des conditions expérimentales utilisées rend particulièrement difficiles la comparaison des études entre elles et la progression dans la compréhension de l'efficacité de ces traitements sur les biofilms bactériens. En ce sens, l'initiative appelée MIABIE (*Minimum Information About a Biofilm Experiment* ou Informations minimales relatives à une expérimentation sur les biofilms) a été proposée en 2014 (Lourenço et al. 2014). Elle propose des recommandations sur les données à enregistrer et à publier afin que la procédure et les résultats puissent être interprétés et reproduits facilement et sans équivoque. Cependant, aucune de ces recommandations ne prend en compte des éléments relatifs à la composition du biofilm en termes de concentration cellulaire ou de composition de la matrice (aspects quantitatifs ou qualitatifs). Ainsi, à la lumière des résultats de ces travaux

de thèse, la prise en compte de ces deux éléments lors de l'évaluation d'un traitement biocide serait une amélioration notable des protocoles existants.

En ce qui concerne les dispositifs physiques, ils sont extrêmement variables, de même que les conditions d'application, et ce d'autant plus qu'il s'agit principalement de prototypes propres à chaque laboratoire. Ainsi, (Gilmore et al. 2018) ont proposé de considérer un guide similaire baptisé MICAPE (Minimum Information about a CAP Experiment) or MIAPME (Minimum Information About a Plasma Medicine Experiment) . En ce qui concerne les LED UV-C, les travaux étant plus récents, il n'existe pas encore de proposition de guide expérimental, mais le besoin a également été exprimé (Song et al. 2016; Gora et al. 2019) et certains auteurs ont déjà commencé à travailler à la caractérisation de la dose apportée par les LED UV-C ou à la définition de conditions expérimentales et de méthodes analytiques (Kheyrandish et al. 2018; Gora et al. 2019).

Finalement, la meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces traitements physiques innovants sur les biofilms microbiens en vue de leur utilisation future dans les domaines industriels ou médicaux reste donc un sujet majeur d'étude, nécessitant de l'interdisciplinarité, une harmonisation des pratiques, et une description complète des données.

Références bibliographiques

- Abramzon N, Joaquin JC, Bray J, Brelles-Mariño G (2006) Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet. *IEEE Trans Plasma Sci* 34:1304–1309 . doi: 10.1109/TPS.2006.877515
- Akgün MP, Ünlütürk S (2017) Effects of ultraviolet light emitting diodes (LEDs) on microbial and enzyme inactivation of apple juice. *Int J Food Microbiol* 260:65–74 . doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.007
- Akinbobola AB, Sherry L, Mckay WG, Ramage G, Williams C (2017) Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro biofilms to high-level peracetic acid disinfection. *J Hosp Infect* 97:162–168 . doi: 10.1016/j.jhin.2017.06.024
- Alkawareek MY, Algwari QT, Gorman SP, Graham WG, O’Connell D, Gilmore BF (2012a) Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:381–384 . doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00942.x
- Alkawareek MY, Algwari QT, Laverty G, Gorman SP, Graham WG, O’Connell D, Gilmore BF (2012b) Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Atmospheric Pressure Non-Thermal Plasma. *PLoS One* 7:13–15 . doi: 10.1371/journal.pone.0044289
- Alkawareek MY, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF (2014) Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int J Antimicrob Agents* 43:154–160 . doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.08.022
- Allison DG (2003) The biofilm matrix. *Biofouling* 19:139–150 . doi: 10.1080/0892701031000072190
- Alonso B, Cruces R, Pérez A, Sánchez-Carrillo C, Guembe M (2017) Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Microbiol Methods* 139:135–137 . doi: 10.1016/j.mimet.2017.06.004
- Alshraiedeh NH, Higginbotham S, Flynn PB, Alkawareek MY, Tunney MM, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF (2016) International Journal of Antimicrobial Agents Eradication and phenotypic tolerance of *Burkholderia cenocepacia* biofilms exposed to atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int J Antimicrob Agents* 47:446–450 . doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.03.004
- Alvarez-Ordóñez A, Mouwen DJM, López M, Prieto M (2011) Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 84:369–378 . doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.009
- Àlvarez G, González M, Isabal S, Blanc V, León R (2013) Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express* 3:1 . doi: 10.1186/2191-0855-3-1
- Amari M (2012) Caractérisation d’enzymes productrices de glucanes de bactérie lactiques de levains de panification. Université de Toulouse
- Amine Ben Mlouka M, Cousseau T, Di Martino P (2016) Application of fluorescently labelled lectins for the study of polysaccharides in biofilms with a focus on biofouling of nanofiltration membranes. *AIMS Mol Sci* 3:338–356 . doi: 10.3934/molsci.2016.3.338
- Anderson GG, O’Toole GA (2008) Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial

- Biofilms. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 85–105
- Arena MP, Capozzi V, Spano G, Fiocco D (2017) The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:2641–2657 . doi: 10.1007/s00253-017-8182-z
- Argyaki A, Markvart M, Bjørndal L, Bjarnsholt T, Petersen PM (2017) Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm after ultraviolet light-emitting diode treatment: a comparative study between ultraviolet C and ultraviolet B. *J Biomed Opt* 22:065004 . doi: 10.1117/1.JBO.22.6.065004
- Augustin M, Ali-Vehmas T, Atroshi F (2004) Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *J Pharm Pharm Sci* 7:55–64
- Ayrapetyan M, Oliver JD (2016) The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Curr Opin Food Sci* 8:127–133 . doi: 10.1016/j.cofs.2016.04.010
- Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD (2014) Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl Environ Microbiol* 80:2478–2483 . doi: 10.1128/AEM.00080-14
- Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z, Kačániová M, Knøchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C (2017) Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 43:313–351 . doi: 10.1080/1040841X.2016.1208146
- Badel S, Laroche C, Gardarin C, Bernardi T, Michaud P (2008) New method showing the influence of matrix components in leuconostoc mesenteroides biofilm formation. *Appl Biochem Biotechnol* 151:364–370 . doi: 10.1007/s12010-008-8199-y
- Bak J, Ladefoged SD, Tvede M, Begovic T, Gregersen A (2010) Disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm contaminated tube lumens with ultraviolet C light emitting diodes. *Biofouling* 26:31–38 . doi: 10.1080/08927010903191353
- Barbau-Piednoir E, Mahillon J, Pillyser J, Coucke W, Roosens NH, Botteldoorn N (2014) Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar Enteritidis. *J Microbiol Methods* 103:131–137 . doi: 10.1016/j.mimet.2014.06.003
- Bayliss DL, Walsh JL, Iza F, Shama G, Holah J, Kong MG (2012) Complex responses of microorganisms as a community to a flowing atmospheric plasma. *Plasma Process Polym* 9:597–611 . doi: 10.1002/ppap.201100104
- Beck SE, Ryu H, Boczek LA, Cashdollar JL, Jeanis KM, Rosenblum JS, Lawal OR, Linden KG (2017) Evaluating UV-C LED disinfection performance and investigating potential dual-wavelength synergy. *Water Res* 109:207–216 . doi: 10.1016/j.watres.2016.11.024
- Berridge M, Herst P, Tan A (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Anticancer Res* 34:2195–2202 . doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7
- Bichara M, Meier M, Wagner J, Cordonnier A, Lambert IB (2011) Postreplication repair mechanisms in the presence of DNA adducts in *Escherichia coli*. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 727:104–122 . doi: 10.1016/j.mrrev.2011.04.003
- Bintsis T, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK (2000) Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - A critical review. *J Sci Food Agric* 80:637–645 . doi:

- 10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1
- Björkroth J, Holzappel W (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: *The Prokaryotes*. Springer US, New York, NY, pp 267–319
- Blazewicz SJ, Barnard RL, Daly RA, Firestone MK (2013) Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: Limitations and uses. *ISME J* 7:2061–2068 . doi: 10.1038/ismej.2013.102
- Bosso André C, dos Santos A, Pfeifer CS, Giannini M, Giroto EM, Ferracane JL (2018) Evaluation of three different decontamination techniques on biofilm formation, and on physical and chemical properties of resin composites. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 106:945–953 . doi: 10.1002/jbm.b.33907
- Bounaix MS (2010) Etude de la production d'exopolysaccharides par des souches de bactéries lactiques isolées de levains de panifications. Université Paul Sabatier de Toulouse
- Bounaix MS, Gabriel V, Morel S, Robert H, Rabier P, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C (2009) Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem* 57:10889–10897 . doi: 10.1021/jf902068t
- Bounaix MS, Gabriel V, Robert H, Morel S, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C (2010) Characterization of glucan-producing *Leuconostoc* strains isolated from sourdough. *Int J Food Microbiol* 144:1–9 . doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.026
- Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF (2017) Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol* 123:308–324 . doi: 10.1111/jam.13429
- Bowker C, Sain A, Shatalov M, Ducoste J (2011) Microbial UV fluence-response assessment using a novel UV-LED collimated beam system. *Water Res* 45:2011–2019 . doi: 10.1016/j.watres.2010.12.005
- Bozonnet S, Dols-laffargue M, Pizzut S, Remaud-simeon M, Monsan P, Willemot R-M (2002) Characterization of DSR-E , an α -1, 2 Linkage-Synthesizing Dextranucrase with Two Catalytic Domains. *J Bacteriol* 184:5753 . doi: 10.1128/JB.184.20.5753
- Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R (2005) Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol* 13:20–26 . doi: 10.1016/j.tim.2004.11.006
- Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14:320–330 . doi: 10.1038/nrmicro.2016.34
- Breeuwer P, Abee T (2004) Assessment of the membrane potential, intracellular pH and respiration of bacteria employing fluorescence techniques. *Mol Microb Ecol Manual*, Second Ed 1563–80 . doi: MEM-8.01/1563
- Brelles-Mariño G (2012) Challenges in Biofilm Inactivation: The Use of Cold Plasma as a New Approach. *Bioprocess Biotech* 2: . doi: 10.4172/2155-9821.1000e107
- Brelles-Mariño G (2016) Gas-Discharge Plasma: Biofilm Inactivation. *Encycl Plasma Technol* 498–501 . doi: 10.1081/e-eplt-120050769
- Bridier a., Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27:1017–1032 . doi:

10.1080/08927014.2011.626899

- Bridier A, Sanchez-Vizuete P, Guilbaud M, Piard JC, Naïtali M, Briandet R (2015) Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol* 45:167–178 . doi: 10.1016/j.fm.2014.04.015
- Butot S, Cantergiani F, Moser M, Jean J, Lima A, Michot L, Putallaz T, Stroheker T, Zuber S (2018) UV-C inactivation of foodborne bacterial and viral pathogens and surrogates on fresh and frozen berries. *Int J Food Microbiol* 275:8–16 . doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.016
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3:3–8 . doi: 10.2436/im.v3i1.9235
- Cao Y, Yang P, Lu X, Xiong Z, Ye T, Xiong Q, Sun Z (2011) Efficacy of atmospheric pressure plasma as an antibacterial agent against enterococcus faecalis in vitro. *Plasma Sci Technol* 13:93–98 . doi: 10.1088/1009-0630/13/1/19
- Chen J, Loeb S, Kim JH (2017) LED revolution: Fundamentals and prospects for UV disinfection applications. *Environ Sci Water Res Technol* 3:188–202 . doi: 10.1039/c6ew00241b
- Chen JL, Steele TWJ, Stuckey DC (2018) Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnol Bioeng* 115:351–358 . doi: 10.1002/bit.26475
- Chen N-T, Chang C-W (2010) Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *J Appl Microbiol* 109:623–634 . doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04678.x
- Chevremont AC, Farnet AM, Coulomb B, Boudenne JL (2012a) Effect of coupled UV-A and UV-C LEDs on both microbiological and chemical pollution of urban wastewaters. *Sci Total Environ* 426:304–310 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.043
- Chevremont AC, Farnet AM, Coulomb B, Boudenne JL (2012b) Effect of coupled UV-A and UV-C LEDs on both microbiological and chemical pollution of urban wastewaters. *Sci Total Environ* 426:304–310 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.043
- Choi S, Attri P, Lee I, Oh J, Yun JH, Park JH, Choi EH, Lee W (2017) Structural and functional analysis of lysozyme after treatment with dielectric barrier discharge plasma and atmospheric pressure plasma jet /631/45 /631/57 /101 /82 /145 article. *Sci Rep* 7:2–11 . doi: 10.1038/s41598-017-01030-w
- Codony F, Agustí G, Allué-Guardia A (2015) Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR. *Mol Cell Probes* 29:190–192 . doi: 10.1016/j.mcp.2015.03.003
- Coghlan DR, Mackintosh JA, Karuso P (2005) Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with epicocconone. *Org Lett* 7:2401–2404 . doi: 10.1021/ol050665b
- Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A (2011) Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J Microbiol Methods* 87:89–95 . doi: 10.1016/j.mimet.2011.07.016
- Costerton JW and ZL (1995) Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745 . doi: 10.1007/s00284-011-0034-y
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978) How bacteria stick. *Sci Am* 238:86–95 . doi:

10.1038/scientificamerican0178-86

- Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordaz A (2016) New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Front Microbiol* 7:1–21 . doi: 10.3389/fmicb.2016.01641
- Couto N, Schooling SR, Dutcher JR, Barber J (2015) Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Proteome Res* 14:4207–4222 . doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00312
- Daeschlein G, Napp M, Lutze S, Arnold A, Von Podewils S, Guembel D, Jünger M (2015) Haut- und Wunddekontamination bei multiresistenten bakteriellen Erregern durch Koagulation mit kaltem Atmosphärendruck-Plasma. *JDDG - J Ger Soc Dermatology* 13:143–149 . doi: 10.1111/ddg.12559
- Dai T, Vrahas MS, Murray CK, Hamblin MR (2012) Ultraviolet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Rev Anti Infect Ther* 10:185–95 . doi: 10.1586/eri.11.166
- Dalecki AG, Crawford CL, Wolschendorf F (2016) Targeting Biofilm Associated *Staphylococcus aureus* Using Resazurin Based Drug-susceptibility Assay. *J Vis Exp* 1–6 . doi: 10.3791/53925
- Dalibart M, Servant L (2000) Spectroscopie dans l'infrarouge. *Tech Ingénieur*
- Das T, Manefield M (2012) Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7: . doi: 10.1371/journal.pone.0046718
- Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2:114–22 . doi: 10.1038/nrd1008
- Davis C (2014) Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods* 103:9–17 . doi: 10.1016/j.mimet.2014.04.012
- Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Cámara M, Williams P, Winzer K (2006) The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 8:1095–1104 . doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.001001.x
- Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A (2009) Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 11: . doi: 10.1088/1367-2630/11/11/115020
- Dolezalova E, Lukes P (2015) Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of *Escherichia coli* treated with an atmospheric pressure plasma jet. *Bioelectrochemistry* 103:7–14 . doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.08.018
- Doll K, Jongstaphongpun KL, Stumpp NS, Winkel A, Stiesch M (2016) Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J Microbiol Methods* 130:61–68 . doi: 10.1016/j.mimet.2016.07.016
- Domenech M, Pedrero-Vega E, Prieto A, García E (2016) Evidence of the presence of nucleic acids and β -glucan in the matrix of non-typeable *Haemophilus influenzae* in vitro biofilms. *Sci Rep* 6:1–13 . doi: 10.1038/srep36424
- Donlan RM (2001) Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect*

- Dis 33:1387–1392 . doi: 10.1086/322972
- Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881–890 . doi: 10.3201/eid0809.020063
- Duan J, Kasper DL (2011) Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology* 21:401–409 . doi: 10.1093/glycob/cwq171
- Dufour D, Leung V, Lévesque CM (2012) Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Top* 22:2–16 . doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x
- Dunne WM, Dunne WM (2002) Bacterial Adhesion: Seen Any Good Bio Films Lately? *Society* 15:155–166 . doi: 10.1128/CMR.15.2.155
- Elasri MO, Miller R V (1999) Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. 65:2025–2031 . doi: 0099-2240
- Emerson JB, Adams RI, Román CMB, Brooks B, Coil DA, Dahlhausen K, Ganz HH, Hartmann EM, Hsu T, Justice NB, Paulino-Lima IG, Luongo JC, Lymperopoulou DS, Gomez-Silvan C, Rothschild-Mancinelli B, Balk M, Huttenhower C, Nocker A, Vaishampayan P, Rothschild LJ (2017) Schrödinger’s microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome* 5:86 . doi: 10.1186/s40168-017-0285-3
- Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, Moisenovich MM, Romanova JM, Murashev AN, Selezneva II, Shimizu T, Sysolyatina E V., Shaginyan IA, Petrov OF, Mayevsky EI, Fortov VE, Morfill GE, Naroditsky BS, Gintsburg AL (2011) Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol* 60:75–83 . doi: 10.1099/jmm.0.020263-0
- Fabre E, Bozonnet S, Arcache A, Willemot R-M, Vignon M, Monsan P, Remaud-Simeon M (2005) Role of the Two Catalytic Domains of DSR-E Dextranucrase and Their Involvement in the Formation of Highly α Role of the Two Catalytic Domains of DSR-E Dextranucrase and Their Involvement in the Formation of Highly p-1 , 2 Branched Dextran. *J Bacteriol* 187:296–303 . doi: 10.1128/JB.187.1.296
- Fernández A, Shearer N, Wilson DR, Thompson A (2012) Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int J Food Microbiol* 152:175–180 . doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.038
- Feuillat M, Perrot C, Vieudrin C, Feuillat M, Perrot C, Vieudrin C (1971) Essai d’amélioration du test à la résazurine pour le contrôle de la qualité bactériologique du lait. 51:545–558. doi: 10.1051/lait:197150827
- Fittipaldi M, Nocker A, Codony F (2012) Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods* 91:276–289 . doi: 10.1016/j.mimet.2012.08.007
- Flemming H-C (2014) The Biofilm Mode of Life. *Ecol Biochem* 277–291. doi: 10.1002/9783527686063.ch14
- Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14:563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94

- Flemming HC, Wingender J (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–633. doi: 10.1038/nrmicro2415
- Flynn PB, Buseti A, Wielogorska E, Chevallier OP, Elliott CT, Lavery G, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF (2016) Non-thermal plasma exposure rapidly attenuates bacterial AHL-dependent quorum sensing and virulence. *Sci Rep* 6: . doi: 10.1038/srep26320
- Flynn PB, Gilmore BF (2018) Understanding plasma biofilm interactions for controlling infection and virulence
- Flynn PB, Graham WG, Gilmore BF (2019) *Acinetobacter baumannii* biofilm biomass mediates tolerance to cold plasma. *Lett Appl Microbiol* 68:344–349. doi:10.1111/lam.13122
- Flynn PB, Higginbotham S, Alshraideh NH, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF (2015) Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 46:101–107. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.026
- Fong JN., Yildiz F. (2015) Biofilm matrix proteins. *Microbiol Spectr* 3:1–27. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.Biofilm
- Gambino M, Cappitelli F (2016) Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling* 32:167–178 . doi: 10.1080/08927014.2015.1134515
- Gao Q, Garcia-pichel F (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. 9:791–802. doi: 10.1038/nrmicro2649
- Gayán E, Condón S, Álvarez I (2014) Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: A Review. *Food Bioprocess Technol* 7:1–20. doi: 10.1007/s11947-013-1168-7
- Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA (2011) Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* 77:5238–5246. doi: 10.1128/AEM.00637-11
- Ghimire H, Venkataramani M, Bian Z, Liu Y, Perera AGU (2017) ATR-FTIR spectral discrimination between normal and tumorous mouse models of lymphoma and melanoma from serum samples. *Sci Rep* 7:1–9. doi: 10.1038/s41598-017-17027-4
- Gilmore BF (2015) The matrix revisited : understanding the role of extracellular matrix components in biofilm tolerance to atmospheric pressure non-thermal plasma exposure. 22nd Int Symp Plasma Chem 5-10 July 5–7
- Gilmore BF, Flynn PB, Brien SO, Hickok N, Freeman T, Bourke P (2018) Cold Plasmas for Biofilm Control: Opportunities and Challenges. *Trends Biotechnol* 1–12. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.03.007
- Gora SL, Rauch KD, Ontiveros CC, Stoddart AK, Gagnon GA (2019) Inactivation of biofilm-bound *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using UVC light emitting diodes (UVC LEDs). *Water Res* 151:193–202 . doi: 10.1016/j.watres.2018.12.021
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221–224. doi: 10.1093/molbev/msp259
- Gracias KS, McKillip JL (2004) A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can J Microbiol* 50:883–890. doi: 10.1139/w04-080

- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M (2002) Food spoilage–interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol* 78:79–97 . doi: 10.1016/S0168-1605(02)00233-7
- Gray NF (2013) *Ultraviolet Disinfection*, Second Edi. Elsevier
- Groenning M (2010) Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J Chem Biol* 3:1–18 . doi: 10.1007/s12154-009-0027-5
- Günther F, Scherrer M, Kaiser SJ, DeRosa A, Mutters NT (2017) Comparative testing of disinfectant efficacy on planktonic bacteria and bacterial biofilms using a new assay based on kinetic analysis of metabolic activity. *J Appl Microbiol* 122:625–633 . doi: 10.1111/jam.13358
- Gupta A, Vikas N, Singh B (2017) Cold plasma for food processing. In: *Food Science and Technology*. pp 623–660
- Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P (2016) Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol* 198:1–15 . doi: 10.1007/s00203-015-1148-6
- Gwynne PJ, Gallagher MP (2018) Light as a Broad-Spectrum Antimicrobial. *Front Microbiol* 9:119 . doi: 10.3389/fmicb.2018.00119
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108 . doi: 10.1038/nrmicro821
- Hammes F, Berney M, Egli T (2010) *Cultivation-independent Assessment of Bacterial Viability*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 123–150
- Han L, Patil S, Boehm D, Milosavljević V, Cullen PJ, Bourke P (2015) Mechanism of Inactivation by High Voltage Atmospheric Cold Plasma Differs between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Running. 1–37 . doi: 10.1128/AEM.02660-15
- Hancock RE (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27:93–9 . doi: 10.1086/514909
- Hauser A, Ozer E (2011) *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Rev Microbiol* 9:
- Haynes WM (2011) *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC Press
- Helgadóttir S, Pandit S, Mokkapati VRSS, Westerlund F, Apell P, Mijakovic I (2017) Vitamin C Pretreatment Enhances the Antibacterial Effect of Cold Atmospheric Plasma. *Front Cell Infect Microbiol* 7:43 . doi: 10.3389/fcimb.2017.00043
- Hemme D, Foucaud-Scheunemann C (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J* 14:467–494 . doi: 10.1016/j.idairyj.2003.10.005
- Hermanson GT (2013) Fluorescent probes. In: *Bioconjugate Techniques*. p 1140
- Hertwig C, Steins V, Reineke K, Rademacher A, Klocke M, Rauh C, Schlöter O (2015) Impact of surface structure and feed gas composition on *Bacillus subtilis* endospore inactivation during direct plasma treatment. *Front Microbiol* 6:1–12 . doi: 10.3389/fmicb.2015.00774
- Hixon SC, White WE, Yielding KL (1975) Selective covalent binding of an ethidium analog to

- mitochondrial DNA with production of petite mutants in yeast by photoaffinity labeling. *J Mol Biol* 92:319–329 . doi: 10.1016/0022-2836(75)90231-4
- Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR (2015) Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* 39:649–669 . doi: 10.1093/femsre/fuv015
- Hoffmann C, Berganza C, Zhang J (2013) Cold Atmospheric Plasma : methods of production and application in dentistry and oncology. 1–15
- Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322–332 . doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
- Hosseinzadeh Colagar A, Memariani H, Sohbatzadeh F, Valinataj Omran A (2013) Nonthermal atmospheric argon plasma jet effects on escherichia coli biomacromolecules. *Appl Biochem Biotechnol* 171:1617–1629 . doi: 10.1007/s12010-013-0430-9
- Humbert F, Quilès F (2011) In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy. 889–895
- Ikawa S, Kitano K, Hamaguchi S (2010) Effects of pH on bacterial inactivation in aqueous solutions due to low-temperature atmospheric pressure plasma application. *Plasma Process Polym* 7:33–42 . doi: 10.1002/ppap.200900090
- Ilanchelian M, Ramaraj R (2004) Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA. *J Photochem Photobiol A Chem* 162:129–137 . doi: 10.1016/S1010-6030(03)00320-4
- Jakubovics N s., Shields R c., Rajarajan N, Burgess J g. (2013) Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol* 57:467–475 . doi: 10.1111/lam.12134
- Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S (2014) Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol* 30:1159–1168 . doi: 10.1007/s11274-013-1552-5
- Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ, Howell PL, Parsek MR (2015) Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci* 112:11353–11358 . doi: 10.1073/pnas.1503058112
- Jiang LM, Hoogenkamp MA, Van Der Sluis LWM, Wesselink PR, Crielaard W, Deng DM (2011) Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *J Endod* 37:31–35 . doi: 10.1016/j.joen.2010.09.007
- Jones CC, Valdeig S, Sova RM, Weiss CR (2016) Inside-out Ultraviolet-C Sterilization of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm In Vitro. *Photochem Photobiol* 92:835–841 . doi: 10.1111/php.12637
- Joshi SG, Paff M, Friedman G, Fridman G, Fridman A, Brooks AD (2010) Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. *Am J Infect Control* 38:293–301 . doi: 10.1016/j.ajic.2009.11.002
- Judée F, Fongia C, Ducommun B, Yousfi M, Lobjois V, Merbahi N (2016) Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids. *Sci Rep* 6:1–12 . doi: 10.1038/srep21421

- Judée F, Wattieaux G, Merbahi N, Mansour M, Castani?-Cornet MP (2014) The antibacterial activity of a microwave argon plasma jet at atmospheric pressure relies mainly on UV-C radiations. *J Phys D Appl Phys* 47:405201 . doi: 10.1088/0022-3727/47/40/405201
- Jung MY, Lee J, Park B, Hwang H, Sohn S-O, Lee SH, Lim HI, Park HW, Lee J-H (2017) Applicability of a colorimetric method for evaluation of lactic acid bacteria with probiotic properties. *Food Microbiol* 64:33–38 . doi: 10.1016/J.FM.2016.12.008
- Junqua R (2017) Procédés innovants de stabilisation microbiologique des moûts et des vins. Université de Bordeaux
- Kaletunç G, Lee J, Alpas H, Bozoglu F (2004) Evaluation of Structural Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microbiol* 70:1116–1122 . doi: 10.1128/AEM.70.2.1116-1122.2004
- Kamgang-Youbi G, Herry JM, Brisset JL, Bellon-Fontaine MN, Doubla A, Naïtali M (2008) Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/ detached state: Case of *Hafnia alvei* inactivation by Plasma Activated Water. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:449–457 . doi: 10.1007/s00253-008-1641-9
- Kamgang JO, Briandet R, Herry JM, Brisset JL, Naïtali M (2007) Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air. *J Appl Microbiol* 103:621–628 . doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03286.x
- Kammeyer A, Luiten RM (2015) Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev* 21:16–29 . doi: 10.1016/j.arr.2015.01.001
- Keer JT, Birch L (2003) Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods* 53:175–183 . doi: 10.1016/S0167-7012(03)00025-3
- Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R, Trink B (2011) Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br J Cancer* 105:1295–1301 . doi: 10.1038/bjc.2011.386
- Keklik NM, Demirci A (2014) Applications and Modeling Aspects of UV and Pulsed UV-Light for Food Decontamination. In: Boziaris IS (ed) *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*. CRC Press, pp 67–101
- Keklik NM, Krishnamurthy K, Demirci A (2012) *Microbial decontamination of food by ultraviolet (UV) and pulsed UV light*. Woodhead Publishing Limited
- Khan MSI, Lee E-J, Kim Y-J (2016) A submerged dielectric barrier discharge plasma inactivation mechanism of biofilms produced by *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, and *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 6:37072 . doi: 10.1038/srep37072
- Khelissa SO, Abdallah M, Jama C, Faille C, Chihib NE (2017) Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. *J Mater Environ Sci* 8:3326–3346
- Kheyrandish A, Mohseni M, Taghipour F (2017) Development of a method for the characterization and operation of UV-LED for water treatment. *Water Res* 122:570–579 . doi: 10.1016/j.watres.2017.06.015
- Kheyrandish A, Mohseni M, Taghipour F (2018) Protocol for Determining Ultraviolet Light Emitting Diode (UV-LED) Fluence for Microbial Inactivation Studies. *Environ Sci Technol* 52:7390–7398 . doi: 10.1021/acs.est.7b05797

- Kibbe WA (2007) OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35:43–46 . doi: 10.1093/nar/gkm234
- Kim DK, Kim SJ, Kang DH (2017) Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Res Int* 97:280–287 . doi: 10.1016/j.foodres.2017.04.009
- Kishen A, Haapasalo M (2010) Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Top* 22:58–78 . doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00285.x
- Klausen M, Gjermansen M, Kreft JU, Tolker-Nielsen T (2006) Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: Examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 261:1–11 . doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x
- Kolb JF, Mattson AM, Edelblute CM, Hao X, Malik MA, Heller LC (2012) Cold DC-operated air plasma jet for the inactivation of infectious microorganisms. *IEEE Trans Plasma Sci* 40:3007–3026 . doi: 10.1109/TPS.2012.2216292
- Korachi M, Aslan N (2013) Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Microb Pathog Strateg Combat them Sci Technol Educ* 1:453–459
- Kovalova Z, Leroy M, Kirkpatrick MJ, Odic E, Machala Z (2016) Corona discharges with water electro spray for *Escherichia coli* biofilm eradication on a surface. *Bioelectrochemistry* 112:91–99 . doi: 10.1016/j.bioelechem.2016.05.002
- Lackmann J-W, Schneider S, Edengeiser E, Jarzina F, Brinckmann S, Steinborn E, Havenith M, Benedikt J, Bandow JE (2013) Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J R Soc Interface* 10:20130591
- Lackmann JW, Bandow JE (2014) Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6205–6213 . doi: 10.1007/s00253-014-5781-9
- Laroussi M (2009) Low-Temperature Plasmas for Medicine? *IEEE Trans Plasma Sci* 37:714–725 . doi: 10.1109/TPS.2009.2017267
- Laroussi M (2018) Effects of Low Temperature Plasmas on Proteins. *IEEE Trans Radiat Plasma Med Sci* 7311:1–1 . doi: 10.1109/TRPMS.2018.2796308
- Laroussi M (2002) Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci* 30:1409–1415 . doi: 10.1109/TPS.2002.804220
- Laroussi M, Leipold F (2004) Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrom* 233:81–86 . doi: 10.1016/j.ijms.2003.11.016
- Laroussi M, Lu X, Keidar M (2017) Perspective: The physics, diagnostics, and applications of atmospheric pressure low temperature plasma sources used in plasma medicine. *J Appl Phys* 122: . doi: 10.1063/1.4993710
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *JBacteriol* 173:6558–6567

- Leathers TD, Bischoff KM (2011) Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnol Lett* 33:517–523 . doi: 10.1007/s10529-010-0450-2
- Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C (2014) Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 78:510–543 . doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- Lebeaux D, Ghigo J (2012) associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques
- Lee HJ, Park SY, Kim J (2000) Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. *FEMS Microbiol Lett* 193:243–247 . doi: 10.1016/S0378-1097(00)00489-4
- Lee K, Yoon SS (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol* 27:1053–1064 . doi: 10.4014/jmb.1611.11056
- Lee Y, Kim K, Kang K-T, Lee J-S, Yang SS, Chung W-H (2014) Atmospheric-pressure plasma jet induces DNA double-strand breaks that require a Rad51-mediated homologous recombination for repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 560:1–9 . doi: 10.1016/j.abb.2014.07.029
- Lembre P, Lorentz C, Di P (2012) Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. *The Complex World of Polysaccharides*. doi: 10.5772/51213
- Lewis K (2008) *Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 107–131
- Liao X, Liu D, Xiang Q, Ahn J, Chen S, Ye X, Ding T (2017) Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control* 75:83–91 . doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.021
- Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ, Cruz S (2015) Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr* 3:1–30 . doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.Bacterial
- Lin S, Yang L, Chen G, Li B, Chen D, Li L, Xu Z (2017) Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix. *Microb Pathog* 111:285–291 . doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.005
- Lourenço A, Coenye T, Goeres DM, Donelli G, Azevedo AS, Ceri H, Coelho FL, Flemming HC, Juhna T, Lopes SP, Oliveira R, Oliver A, Shirtliff ME, Sousa AM, Stoodley P, Pereira MO, Azevedo NF (2014) Minimum information about a biofilm experiment (MIABiE): Standards for reporting experiments and data on sessile microbial communities living at interfaces. *Pathog Dis* 70:250–256 . doi: 10.1111/2049-632X.12146
- Løvdaal T, Hovda MB, Björkblom B, Møller SG (2011) Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J Microbiol Methods* 85:164–169 . doi: 10.1016/J.MIMET.2011.01.027
- Lu H, Patil S, Keener KM, Cullen PJ, Bourke P (2014) Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: Influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. *J Appl Microbiol* 116:784–794 . doi: 10.1111/jam.12426
- Lunov O, Zablotskii V, Churpita O, Jäger A, Polívka L, Syková E, Dejneka A, Kubinová Š (2016) The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* 82:71–83 . doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.027

- Luo Y, Bolt HL, Eggimann GA, McAuley DF, McMullan R, Curran T, Zhou M, Jahoda PCAB, Cobb SL, Lundy FT (2017) Peptoid Efficacy against Polymicrobial Biofilms Determined by Using Propidium Monoazide-Modified Quantitative PCR. *ChemBioChem* 18:111–118 . doi: 10.1002/cbic.201600381
- Ma R, Wang G, Tian Y, Wang K, Zhang J, Fang J (2015) Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *J Hazard Mater* 300:643–651 . doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.07.061
- Mah, T.F. and O’Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9:9, 34–39
- Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy AB (2016) Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep* 6:38610 . doi: 10.1038/srep38610
- Mai-Prochnow A, Murphy AB, McLean KM, Kong MG, Ostrikov K (2014) Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int J Antimicrob Agents* 43:508–517 . doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025
- Malayeri AH, Mohseni M, Cairns B, Bolton JR (2016) UV dose required to achieve incremental log inactivation of bacteria, protozoa and viruses. *IUVA News* 18:4–6
- Mann EE, Wozniak DJ (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* 36:893–916 . doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x
- Marchal F, Robert H, Merbahi N, Fontagné-Faucher C, Mohammed Y, Romain C-E, Eichwald O, Rondel C, Gabriel B (2012) Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. *J Phys D Appl Phys* 45:345202
- Marchal F, Robert H, Merbahi N, Randrianjatovo I, Martino P, Yousfi M, Neuhauser E (2013) Atmospheric cold plasmas for biofilm inactivation: does biofilm extracellular matrix limit the bactericidal process? *J Eng Technol Res* 1:123–135
- Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Carnero-Varo M, Fernandez-Crehuet J (2009) Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:773–783 . doi: 10.1007/s00253-009-1879-x
- Matafonova G, Batoev V (2018) Recent advances in application of UV light-emitting diodes for degrading organic pollutants in water through advanced oxidation processes: A review. *Water Res* 132:177–189 . doi: 10.1016/j.watres.2017.12.079
- Maunder E, Welch M (2017) Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 364:1–10 . doi: 10.1093/femsle/fnx120
- McBain AJ (2009) Chapter 4 In Vitro Biofilm Models. An Overview, 1st edn. Elsevier Inc.
- McDougald D. RSAWDKS (1998) Nonculturability: adaption or debilitation? *Microbiol Ecol* 25:1–9
- McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S (2012) Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10:39–50 . doi: 10.1038/nrmicro2695
- Meliani, Bensoltane (2015) Review of *Pseudomonas* attachment and biofilm formation in food industry. *Poult Fish Wildl Sci* 3:1–7 . doi: 10.4172/2375-446X.1000126

- Mendis DA, Rosenberg M, Azam F (2000) A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Trans Plasma Sci* 28:1304–1306 . doi: 10.1109/27.893321
- Merbahi N, Yousfi M, P. J, Eichwald O, Ricard A, Gardou JP, Ducasse O, Benhenni M (2011) Device for emitting a plasma jet from the atmospheric pressure air at ambient temperature and pressure, and use of said device Nof the international Publication of the patent: WO 170. In: Fazel R (ed) *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTech
- Messina G, Burgassi S, Messina D, Montagnani V, Cevenini G (2015) A new UV-LED device for automatic disinfection of stethoscope membranes. *Am J Infect Control* 43:e61–e66 . doi: 10.1016/j.ajic.2015.06.019
- Min TG, Kang WS (2011) Simple, quick and nondestructive method for Brassicaceae seed viability measurement with single seed base using resazurin. *Hortic Environ Biotechnol* 52:240–245 . doi: 10.1007/s13580-011-0182-9
- Misra NN, Schlüter O, Cullen PJ (2016) Plasma in Food and Agriculture. *Cold Plasma Food Agric* 1–16 . doi: 10.1016/B978-0-12-801365-6.00001-9
- Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot R-M, Remaud-Siméon M (2001) Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11:675–685 . doi: 10.1016/S0958-6946(01)00113-3
- Monsan PF, Ouarné F (2009) Oligosaccharides derived from sucrose. In: Charalampopoulos D, Rastall RA (eds) *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer New York, New York, NY, pp 293–336
- Moore ERB, Tindall BJ, Martins Dos Santos VAP, Pieper DH, Ramos J-L, Palleroni NJ (2006) Nonmedical: *Pseudomonas*. In: *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp 646–703
- Müller A, Noack L, Greiner R, Stahl MR, Posten C (2014) Effect of UV-C and UV-B treatment on polyphenol oxidase activity and shelf life of apple and grape juices. *Innov Food Sci Emerg Technol* 26:498–504 . doi: 10.1016/j.ifset.2014.05.014
- Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, Vandamme EJ (2005) *Leuconostoc* dextranucrase and dextran: production, properties and applications. *J Chem Technol Biotechnol* 80:845–860 . doi: 10.1002/jctb.1322
- Natto MJ, Savioli F, Quashie NB, Dardonville C, Rodenko B, de Koning HP (2012) Validation of novel fluorescence assays for the routine screening of drug susceptibilities of *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother* 67:933–943 . doi: 10.1093/jac/dkr572
- Neu T, Kuhlicke U (2017) Fluorescence Lectin Bar-Coding of Glycoconjugates in the Extracellular Matrix of Biofilm and Bioaggregate Forming Microorganisms. *Microorganisms* 5:5 . doi: 10.3390/microorganisms5010005
- Nguyen MH, Ojima Y, Sakka M, Sakka K, Taya M (2014) Probing of exopolysaccharides with green fluorescence protein-labeled carbohydrate-binding module in *Escherichia coli* biofilms and flocs induced by *bcsB* overexpression. *J Biosci Bioeng* 118:400–405 . doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.03.005
- Nikolaev YA, Plakunov VK (2007) Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76:125–138 . doi: 10.1134/S0026261707020014

- Nivens DE, Palmer RJ, White DC (1995) Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: A review of analytical techniques. *J Ind Microbiol* 15:263–276 . doi: 10.1007/BF01569979
- Nocker A, Camper AK (2009) Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett* 291:137–142 . doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01429.x
- Nocker A, Cheung C-Y, Camper AK (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 67:310–320 . doi: 10.1016/j.mimet.2006.04.015
- Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K (2003) Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 34:804–813
- O'Brian J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267:5421–5426 . doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- O'Toole GA, Kolter R (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30:295–304 . doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x
- O'Toole GA, Kolter R (1998b) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol Microbiol* 28:449–461 . doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- Okazaki Y, Wang Y, Tanaka H, Mizuno M, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Uchida K, Kikkawa F, Hori M, Hori M, Toyokuni S (2014) Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. *J Clin Biochem Nutr* 55:207–215 . doi: 10.3164/jcfn.14
- Okshevsky M, Meyer RL (2015) The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol* 41:341–352 . doi: 10.3109/1040841x.2013.841639
- Okshevsky M, Meyer RL (2014) Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *J Microbiol Methods* 105:102–104 . doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.010
- Okshevsky M, Meyer RL (2013) The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol* 7828:1–11 . doi: 10.3109/1040841X.2013.841639
- Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL (2015) Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol* 33:73–80 . doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.002
- Okuda KI, Zendo T, Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Yamada S, Sonomoto K, Mizunoe Y (2013) Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5572–5579 . doi: 10.1128/AAC.00888-13
- Oliver JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43 Spec No:93–100 . doi: 2134 [pii]
- Olwal CO, Ochiel DO, Onyango DM, Ang'ienda PO (2017) Bacterial biofilm cells quantification techniques: where is consensus in over two decades? *J Microbiol Biotechnol Food Sci*

- 7:168–173 . doi: <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.2.168-173>
- Pajkos A, Vickery K, Cossart Y (2004) Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? *J Hosp Infect* 58:224–229 . doi: [10.1016/j.jhin.2004.06.023](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.06.023)
- Pan M, Zhu L, Chen L, Qiu Y, Wang J (2016) Detection Techniques for Extracellular Polymeric. 11:8092–8115
- Pan Y, Breidt F (2007) Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol* 73:8028–8031 . doi: [10.1128/AEM.01198-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01198-07)
- Pankaj S, Wan Z, Keener K (2018) Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods* 35:5–17 . doi: [10.3390/foods7010004](https://doi.org/10.3390/foods7010004)
- Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F (2013) Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig* 25:31–42 . doi: [10.7416/ai.2013.1904](https://doi.org/10.7416/ai.2013.1904)
- Papenfort K, Bassler BL (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14:576–588 . doi: [10.1038/nrmicro.2016.89](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89)
- Passerini D, Vuillemin M, Laguerre S, Amari M, Loux V, Gabriel V, Robert H, Morel S, Monsan P, Gabriel B, Fontagné-Faucher C, Remaud-Siméon M, Moulis C (2014) Complete Genome Sequence of *Leuconostoc citreum* Strain NRRL B-742. *Genome Announc* 2:3093–3094 . doi: [10.1128/genomeA.01179-14](https://doi.org/10.1128/genomeA.01179-14)
- Passerini D, Vuillemin M, Ufarté L, Morel S, Loux V, Fontagné-Faucher C, Monsan P, Remaud-Siméon M, Moulis C (2015) Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 - Identification of three novel α -transglucosylases. *FEBS J* 282:2115–2130 . doi: [10.1111/febs.13261](https://doi.org/10.1111/febs.13261)
- Patil S, Bourke P (2016) Principles of Nonthermal Plasma Decontamination. *Cold Plasma Food Agric* 143–177 . doi: [10.1016/B978-0-12-801365-6.00006-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801365-6.00006-8)
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 72:157–165 . doi: [10.1016/j.mimet.2007.11.010](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010)
- Pei X, Lu X, Liu J, Liu D, Yang Y, Ostrikov K, Chu PK, Pan Y (2012) Inactivation of a 25.5 μm *Enterococcus faecalis* biofilm by a room-temperature, battery-operated, handheld air plasma jet. *J Phys D Appl Phys* 45:165205 . doi: [10.1088/0022-3727/45/16/165205](https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/16/165205)
- Peixoto P (2011) Synthèse de nouveaux marqueurs fluorescents basés sur la structure de l'épicocconone pour la détection des protéines
- Perrot S, Dutertre-Catella H, Martin C, Warnet J-M, Rat P (2003) A new nondestructive cytometric assay based on resazurin metabolism and an organ culture model for the assessment of corneal viability. *Cytometry* 55A:7–14 . doi: [10.1002/cyto.a.10067](https://doi.org/10.1002/cyto.a.10067)
- Persat A, Nadell CD, Kim MK, Ingremeau F, Siryaporn A, Drescher K, Wingreen NS, Bassler BL, Gitai Z, Stone HA (2015) The Mechanical World of Bacteria. *Cell* 161:988–997 . doi: [10.1016/J.CELL.2015.05.005](https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.05.005)
- Piard JC, Briandet R (2015) Lactic Acid Bacteria Biofilms: From their Formation to their Health

- and Biotechnological Potential. *Biotechnol Lact Acid Bact Nov Appl Second Ed* 341–361 . doi: 10.1002/9781118868386.ch20
- Pinto D, Santos MA, Chambel L (2013) Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol* 41:61–76 . doi: 10.3109/1040841X.2013.794127
- Pires DP, Melo LDR, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J (2017) Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr Opin Microbiol* 39:48–56 . doi: 10.1016/j.mib.2017.09.004
- Prescott LM, Klein PH (2002) *Microbiology*, 5th edn.
- Puligundla P, Mok C (2017) Potential applications of nonthermal plasmas against biofilm-associated micro-organisms *in vitro*. *J Appl Microbiol* 122:1134–1148 . doi: 10.1111/jam.13404
- Quijada NM, Fongaro G, Barardi CRM, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D (2016) Propidium monoazide integrated with qPCR enables the detection and enumeration of infectious enteric RNA and DNA viruses in clam and fermented sausages. *Front Microbiol* 7:1–6 . doi: 10.3389/fmicb.2016.02008
- Quilès F, Humbert F, Delille A (2010) Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 75:610–616 . doi: 10.1016/j.saa.2009.11.026
- Quintas V, Prada-Lopez I, Tomás I (2014) Analyzing the oral biofilm using fluorescence-based microscopy: what's in a dye? *Microsc Adv Sci Res Educ* 226–238
- Rampersad SN (2012) Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)* 12:12347–12360 . doi: 10.3390/s120912347
- Ramsdell GA, Johnson WMT, Evans FR (1935) Investigation of Resazurin as an Indicator of the Sanitary Condition of Milk. *J Dairy Sci* 18:705–717 . doi: 10.3168/jds.S0022-0302(35)93193-9
- Randrianjatovo-Gbalou I (2016) *Substances Exopolymériques de biofilms bactériens : Quantification in situ et Etude de leur rôle dans la cohésion de la matrice extracellulaire*. Université Toulouse III Paul Sabatier
- Randrianjatovo-Gbalou I, Marcato-Romain CE, Girbal-Neuhauser E (2015) Quantification of amyloid fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection. *Anal Biochem* 488:19–21 . doi: 10.1016/j.ab.2015.07.014
- Randrianjatovo-Gbalou I, Rouquette P, Lefebvre D, Girbal-Neuhauser E, Marcato-Romain C-E (2017) In situ analysis of *Bacillus licheniformis* biofilms: amyloid-like polymers and eDNA are involved in the adherence and aggregation of the extracellular matrix. *J Appl Microbiol* 122:1262–1274 . doi: 10.1111/jam.13423
- Randrianjatovo I, Girbal-Neuhauser E, Marcato-Romain C-E (2015) Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4835–4844 . doi: 10.1007/s00253-015-6570-9

- Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int* 2015: . doi: 10.1155/2015/759348
- Rattanakul S, Oguma K (2018) Inactivation kinetics and efficiencies of UV-LEDs against *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, and surrogate microorganisms. *Water Res* 130:31–37 . doi: 10.1016/j.watres.2017.11.047
- Reyneke B, Ndlovu T, Khan S, Khan W (2017) Comparison of EMA-, PMA- and DNase qPCR for the determination of microbial cell viability. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:7371–7383 . doi: 10.1007/s00253-017-8471-6
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (2013) Cell Viability Assays. *Assay Guid Man [Internet]* 114:785–796 . doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006
- Rizzotti L, Levav N, Fracchetti F, Felis GE, Torriani S (2015) Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control* 47:407–412 . doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.052
- Robert H, Gabriel V, Fontagné-Faucher C (2009) Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int J Food Microbiol* 135:53–59 . doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006
- Römling U, Kjelleberg S, Normark S, Nyman L, Uhlin BE, Åkerlund B (2014) Microbial biofilm formation: a need to act. *J Intern Med* 276:98–110 . doi: 10.1111/joim.12242
- Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 12:163–171 . doi: 10.1016/S0958-6946(01)00160-1
- Ruas-madiedo P, Salazar N, Reyes-gavilán CGDL (2009) *Biotechnological and acid bacteria in food and probiotic*, First edit. Elsevier Inc.
- Rupf S, Lehmann A, Hannig M, Sch??fer B, Schubert A, Feldmann U, Schindler A (2010) Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *J Med Microbiol* 59:206–212 . doi: 10.1099/jmm.0.013714-0
- Ryder AG, Power S, Glynn TJ (2003) Fluorescence lifetime based pH sensing using Resorufin. *SPIE Proc Vol 4876* 827–835 . doi: 10.1117/12.463983
- Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 10:644–648 . doi: 10.1016/j.mib.2007.09.010
- Sabaeifard P, Abdi-Ali A, Soudi MR, Dinarvand R (2014) Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *J Microbiol Methods* 105:134–140 . doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.024
- Saidi N, Kouki S, Mehri I, Ben Rejeb A, Belila A, Hassen A, Ouzari H (2011) Biofilm and siderophore effects on secondary waste water disinfection. *Curr Microbiol* 63:337–340 . doi: 10.1007/s00284-011-9983-4
- Samouillan V, Merbahi N, Yousfi M, Gardou J-P, Delaunay F, Dandurand J, Lacabanne C (2012) Effect of Low-Temperature Plasma Jet on Thermal Stability and Physical Structure of Type I Collagen. *IEEE Trans Plasma Sci* 40:1688–1695 . doi: 10.1109/TPS.2012.2190303
- Sandberg ME, Schellmann D, Brunhofer G, Erker T, Busygin I, Leino R, Vuorela PM, Fallarero A

- (2009) Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J Microbiol Methods* 78:104–106 . doi: 10.1016/j.mimet.2009.04.014
- Santos AL, Moreirinha C, Lopes D, Esteves AC, Henriques I, Almeida A, Rosa M, Domingues M, Delgadillo I (2013a) Effects of UV Radiation on the Lipids and Proteins of Bacteria Studied by Mid-Infrared Spectroscopy. doi: 10.1021/es400660g
- Santos AL, Oliveira V, Baptista I, Henriques I, Gomes NCM, Almeida A, Correia A, Cunha Â (2013b) Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch Microbiol* 195:63–74 . doi: 10.1007/s00203-012-0847-5
- Schenk M, Raffellini S, Guerrero S, Blanco GA, Maris S (2011a) Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light : Study of cell injury by flow cytometry. *LWT - Food Sci Technol* 44:191–198 . doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.012
- Schenk M, Raffellini S, Guerrero S, Blanco GA, Maris S (2011b) Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light : Study of cell injury by flow cytometry. *LWT - Food Sci Technol* 44:191–198 . doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.012
- Schlafer S, Meyer RL (2017) Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *J Microbiol Methods* 138:50–59 . doi: 10.1016/J.MIMET.2016.03.002
- Schlegel J, Köritzer J, Boxhammer V (2013) Plasma in cancer treatment. *Clin Plasma Med* 1:2–7 . doi: 10.1016/j.cpme.2013.08.001
- Schlüter O, Ehlbeck J, Hertel C, Habermeyer M, Roth A, Engel KH, Holzhauser T, Knorr D, Eisenbrand G (2013) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods*. *Mol Nutr Food Res* 57:920–927 . doi: 10.1002/mnfr.201300039
- Schmidlin M, Alt M, Brodmann P, Bagutti C (2010) Insufficient Distinction between DNA from Viable and Nonviable *Staphylococcus aureus* Cells in Wipe-Samples by Use of Propidium Monoazide-PCR. *Appl Biosaf* 15:180–185 . doi: 10.1177/153567601001500404
- Schmitt DM, O’Dee DM, Cowan BN, Birch JW-M, Mazzella LK, Nau GJ, Horzempa J (2013) The use of resazurin as a novel antimicrobial agent against *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 3:1–6 . doi: 10.3389/fcimb.2013.00093
- Schmitt J, Flemming H (1994) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Int Biodeterior Biodegradation* 41:1–11 . doi: 10.1007/978-3-642-80017-7_11
- Schnetzinger F, Pan Y, Nocker A (2013) Use of propidium monoazide and increased amplicon length reduce false-positive signals in quantitative PCR for bioburden analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2153–2162 . doi: 10.1007/s00253-013-4711-6
- Scholtz V, Pazlarova J, Souskova H, Khun J, Julak J (2015) Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol Adv* 33:1108–1119 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.002
- Schubert EF, Cho J, Kim JK (2015) Light-Emitting Diodes. *Kirk-Othmer Encycl Chem Technol* 1–20 . doi: 10.1002/0471238961.1209070811091908.a01.pub3
- Seidel L, Strathmann M, Nocker A (2017) The feasibility of improved live-dead distinction in qPCR-based microbial source tracking. *J Microbiol Methods* 140:23–31 . doi: 10.1016/j.mimet.2017.06.013

- Seinige D, Krischek C, Klein G, Kehrenberg C (2014) Comparative analysis and limitations of ethidium monoazide and propidium monoazide treatments for the differentiation of viable and nonviable *Campylobacter* cells. *Appl Environ Microbiol* 80:2186–2192 . doi: 10.1128/AEM.03962-13
- Sharma A, Collins G, Pruden A (2009) Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *J Appl Microbiol* 107:1440–1449 . doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04323.x
- Sholtes KA, Lowe K, Walters GW, Sobsey MD, Linden KG, Casanova LM (2016) Comparison of ultraviolet light-emitting diodes and low-pressure mercury-arc lamps for disinfection of water. *Environ Technol (United Kingdom)* 37:2183–2188 . doi: 10.1080/09593330.2016.1144798
- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S (2010) *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Lab Press. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
- Simões M, Simões LC, Vieira MJ (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci Technol* 43:573–583 . doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008
- Sinha RP, Häder D-P (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1:225–236 . doi: 10.1039/b201230h
- Skindersoe ME, Rasmussen L, Andersen LP, Krogfelt KA (2015) A Novel Assay for Easy and Rapid Quantification of *Helicobacter pylori* Adhesion. *Helicobacter* 20:199–205 . doi: 10.1111/hel.12191
- Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Facon JP, Lina G, Etienne J, Ginevra C (2012) Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *J Microbiol Methods* 88:319–321 . doi: 10.1016/j.mimet.2011.12.010
- Soejima T, Iida KI, Qin T, Taniai H, Seki M, Yoshida SI (2008) Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *J Clin Microbiol* 46:2305–2313 . doi: 10.1128/JCM.02171-07
- Soejima T, Schlitt-Dittrich F, Yoshida SI (2011) Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae*. *Anal Biochem* 418:37–43 . doi: 10.1016/j.ab.2011.06.027
- Solano C, Echeverez M, Lasa I (2014) Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 18:96–104 . doi: 10.1016/J.MIB.2014.02.008
- Soler-arango J, Id CF, Muraca G, Bosch A, Brelles-mari G (2019) The *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix and cells are drastically impacted by gas discharge plasma treatment : A comprehensive model explaining plasma- mediated biofilm eradication. 1–27 . doi: 10.1371/journal.pone.0216817
- Song F, Koo H, Ren D (2015) Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *J Dent Res* 94:1027–1034 . doi: 10.1177/0022034515587690
- Song K, Mohseni M, Taghipour F (2016) Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: A review. *Water Res* 94:341–349 . doi: 10.1016/j.watres.2016.03.003
- Stewart PS, Franklin MJ (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6:199–210 . doi: 10.1038/nrmicro1838

- Stewart PS, William Costerton J (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135–138 . doi: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1
- Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K, Ren Q (2016) Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:4135–4145 . doi: 10.1007/s00253-016-7396-9
- Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q (2015) Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol* 15:1–9 . doi: 10.1186/s12866-015-0376-x
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK-S, Wu Z, Paulsen I., Reizer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S, Olson M V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959–964 . doi: 10.1038/35023079
- Strathmann M, Wingender J, Flemming H-C (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* 50:237–248 . doi: 10.1016/S0167-7012(02)00032-5
- Surowsky B, Bußler S, Schlüter OK (2016) Cold Plasma Interactions With Food Constituents in Liquid and Solid Food Matrices. *Cold Plasma Food Agric* 179–203 . doi: 10.1016/B978-0-12-801365-6.00007-X
- Sutherland I (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3–9
- Taglialegna A, Lasa I, Valle J (2016) Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. *J Bacteriol* 198:2579–2588 . doi: 10.1128/JB.00122-16
- Takahashi H, Gao Y, Miya S, Kuda T, Kimura B (2017) Discrimination of live and dead cells of *Escherichia coli* using propidium monoazide after sodium dodecyl sulfate treatment. *Food Control* 71:79–82 . doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.022
- Talaro KP, Talaro A (2002) *Foundations in microbiology*, 4th edn.
- Tareb R, Bernardeau M, Amiel C, Vernoux JP (2017) Usefulness of FTIR spectroscopy to distinguish rough and smooth variants of *Lactobacillus farciminis* CNCM-I-3699. *FEMS Microbiol Lett* 364:1–8 . doi: 10.1093/femsle/fnw298
- Tavernier S, Coenye T (2015) Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* in multispecies biofilms using PMA-qPCR. *PeerJ* 3:e787 . doi: 10.7717/peerj.787
- Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2013) Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Investig* 17:841–850 . doi: 10.1007/s00784-012-0792-3
- Tawakoli PN, Neu TR, Busck MM, Kuhlicke U, Schramm A, Attin T, Wiedemeier DB, Schlafer S (2017) Visualizing the dental biofilm matrix by means of fluorescence lectin-binding analysis. *J Oral Microbiol* 9:1345581 . doi: 10.1080/20002297.2017.1345581
- Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE (2014) Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR

- to Discriminate between Live and Dead Legionella in Biofilm Samples. *Microbiol Insights* 15–24 . doi: 10.4137/MBI.S17723.RECEIVED
- Tendero C, Tixier C, Tristant P, Desmaison J, Leprince P (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* 61:2–30 . doi: 10.1016/j.sab.2005.10.003
- Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L (2012) Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix. *J Proteome Res* 11:4906–4915 . doi: 10.1021/pr300395j
- Turner M (2016) Physics of Cold Plasma. In: *Cold Plasma in Food and Agriculture*. Academic Press, pp 17–51
- U.S. Food and Drug Administration (2000) Irradiation in the production, processing and handling of food.
- Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T (2014) Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J Microbiol Methods* 98:31–34 . doi: 10.1016/j.mimet.2013.12.011
- van Frankenhuyzen JK, Trevors JT, Lee H, Flemming CA, Habash MB (2011) Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. *J Microbiol Methods* 87:263–272 . doi: 10.1016/j.mimet.2011.09.007
- Van Houdt R, Michiels CW (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol* 109:1117–1131 . doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x
- Vandamme M, Robert E, Pesnel S, Barbosa E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Pape A Le, Pouvesle JM (2010) Antitumor effect of plasma treatment on u87 glioma xenografts: Preliminary results. *Plasma Process Polym* 7:264–273 . doi: 10.1002/ppap.200900080
- Vandecandelaere I, Van Acker H, Coenye T (2016) A microplate-based system as in vitro model of biofilm growth and quantification. In: *Bacterial persistence: methods and protocols*. Humana Press, New York, NY, pp 53–66
- Vandervoort KG, Brelles-Mariño G (2014) Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system. *PLoS One* 9: . doi: 10.1371/journal.pone.0108512
- Vilhunen S, Särkkä H, Sillanpää M (2009) Ultraviolet light-emitting diodes in water disinfection. *Environ Sci Pollut Res* 16:439–442 . doi: 10.1007/s11356-009-0103-y
- Vondrakova L, Turonova H, Scholtz V, Pazlarova J, Demnerova K (2018) Impact of various killing methods on EMA/PMA-qPCR efficacy. *Food Control* 85:23–28 . doi: 10.1016/j.foodcont.2017.09.013
- Wang H, Gill CO, Yang X (2014a) Use of sodium lauroyl sarcosinate (sarkosyl) in viable real-time PCR for enumeration of *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 98:89–93 . doi: 10.1016/j.mimet.2014.01.004
- Wang Y, Li C, Gao C, Ma C, Xu P (2014b) Genome Sequence of the Nonpathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Strain ATCC 15442. *Genome Announc* 2:e00421-14 . doi: 10.1128/genomeA.00421-14

- Wei Q, Ma LZ (2013) Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 14:20983–21005 . doi: 10.3390/ijms141020983
- Whitchurch C, Tolker-Nielsen T, Ragas P (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. 2
- Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860–864 . doi: 10.1038/35101627
- Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J, Okuom M, Huber C, Durham Brooks T, Wilson E, Clement B, Wentworth CD, Holmes AE (2017) Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Rrjet* 6:1–25
- Wingender J, Neu TR, Flemming H-C (1999) What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In: *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–19
- Wu Y, Liang Y, Wei K, Li W, Yao M, Zhang J, Grinshpun SA (2015) MS2 virus inactivation by atmospheric-pressure cold plasma using different gas carriers and power levels. *Appl Environ Microbiol* 81:996–1002 . doi: 10.1128/AEM.03322-14
- Xiong Z, Du T, Lu X, Cao Y, Pan Y (2011) How deep can plasma penetrate into a biofilm? *Appl Phys Lett* 98:194–197 . doi: 10.1063/1.3597622
- Xu H-S, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol* 8:313–323 . doi: 10.1007/BF02010671
- Yahr TL, Parsek MR (2006) *Pseudomonas aeruginosa*. In: *The Prokaryotes*. Springer New York, pp 704–713
- Yan M, Han J, Xu X, Liu L, Gao C, Zheng H, Chen Y, Tao Y, Zhou H, Li Y, Wu Z (2016) Gsy, a novel glucanase from *Leuconostoc mesenteroides*, mediates the formation of cell aggregates in response to oxidative stress. *Nat Publ Gr* 6:38122 . doi: 10.1038/srep38122
- Yasunaga A, Yoshida A, Morikawa K, Maki K, Nakamura S, Soh I, Awano S, Ansai T (2013) Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. *BMC Microbiol* 13:2–6 . doi: 10.1186/1471-2180-13-157
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134 . doi: 10.1186/1471-2105-13-134
- Yousfi M, Merbahi N, P. J, Eichwald O, Ricard A, Gardou JP, Ducasse O, Benhenni M (2011) Non Thermal Plasma Sources of Production of Active Species for Biomedical Uses: Analyses, Optimization and Prospect. In: *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTech
- Yousfi M, Merbahi N, Pathak A, Eichwald O (2014) Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: Toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundam Clin Pharmacol* 28:123–135 . doi: 10.1111/fcp.12018
- Yu H, Perni S, Shi JJ, Wang DZ, Kong MG, Shama G (2006) Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of *Escherichia coli* K12. *J Appl Microbiol* 101:1323–1330 . doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03033.x

- Yusupov M, Bogaerts A, Huygh S, Snoeckx R, van Duin ACT, Neyts EC (2013) Plasma-Induced Destruction of Bacterial Cell Wall Components: A Reactive Molecular Dynamics Simulation. *J Phys Chem C* 117:5993–5998 . doi: 10.1021/jp3128516
- Zare M-R (2016) Simplification and sensitivity study of Alamar Blue bioassay for toxicity assessment in liquid media. *57:37–41* . doi: 10.1080/19443994.2015.1040853
- Zelaya AJ, Stough G, Rad N, Vandervoort K, Brelles-Mariño G (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inactivation: Decreased cell culturability, adhesiveness to surfaces, and biofilm thickness upon high-pressure nonthermal plasma treatment. *IEEE Trans Plasma Sci* 38:3398–3403 . doi: 10.1109/TPS.2010.2082570
- Zhang S, Ye C, Lin H, Lv L, Yu X (2015) UV Disinfection Induces a Vbnc State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Sci Technol* 49:1721–1728 . doi: 10.1021/es505211e
- Zimmermann JL, Dumler K, Shimizu T, Morfill GE, Wolf A, Boxhammer V, Schlegel J, Gansbacher B, Anton M (2011) Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. *J Phys D Appl Phys* 44: . doi: 10.1088/0022-3727/44/50/505201
- Ziuzina D, Boehm D, Patil S, Cullen PJ, Bourke P (2015) Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. *PLoS One* 10:1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0138209

Annexes

Annexe 1: Méthodes d'analyse de la biomasse des biofilms. Légende, NA: non applicable.	292
Annexe 2: Méthodes d'extraction des EPS de biofilms (Pan et al. 2016).....	293
Annexe 3: Marqueurs fluorescents des composés de la matrice des biofilms couramment utilisés en microscopie confocale à balayage laser	294
Annexe 4: Référence des réactifs utilisés.....	295
Annexe 5: Avantages et inconvénients des méthodes de formation de biofilms modèles envisagées pour l'étude	296
Annexe 6: Analyse spectrale du dextrane formé et purifié par la souche <i>L. citreum</i> B-1299	297
Annexe 7: Résultats de qPCR	298
Annexe 8: Composition du milieu TS	299

Annexe 1: Méthodes d'analyse de la biomasse des biofilms. Légende, NA : non applicable

Technique	Approche	Utilisation in-situ et ex-situ	Temps de mise en œuvre	Matériel	Avantages	Inconvénients	Références
Crystal violet	Marquage des molécules de charge négative	<i>in-situ</i>	Rapide (1 à 2 h)	Spectrophotomètre	Facile à réaliser, haut débit, applicable sur une grande variété de microorganismes	Sensibles à la sédimentation, les biofilms faiblement liés ne sont pas quantifiés (reproductibilité variable)	(Pantarella et al. 2013; Azeredo et al. 2017; Wilson et al. 2017)
Masse sèche ou poids sec	Pesée de l'échantillon (déshydraté)	<i>in-situ</i>	Dépend du temps de déshydratation	Étuve, balance de pesée	Facile, non coûteux	Peu sensible aux variations	(Azeredo et al. 2017; Wilson et al. 2017)
Microscopie électronique à balayage (MEB)	Balayage d'un faisceau d'électrons à la surface d'un échantillon et analyse des interactions	<i>in-situ</i>	Heures ou jours	-Étuve -Microscope MEB	Permet de visualiser la surface et la forme de l'échantillon, haute résolution (50 à 100nm)	Échantillon déshydraté, coûteux, NA sur du vivant, résistant à un vide poussé	(Pantarella et al. 2013; Azeredo et al. 2017; Wilson et al. 2017)
Microscopie électronique à balayage à chambre environnementale (MEBE)	Idem MEB mais se produit en présence d'un gaz	<i>in-situ</i>	Heures ou jours	Microscope MEBE	Permet de visualiser la surface et la forme de l'échantillon, haute résolution, réalisable sur biofilms hydratés	Coûteux, résolution plus faible que le MEB	(Pantarella et al. 2013; Azeredo et al. 2017; Wilson et al. 2017)
Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	Analyse de l'absorbance d'un rayonnement infrarouge	<i>in-situ</i>	- Dépend du temps de déshydratation - Analyse d'un échantillon quelques minutes	Spectroscopie FTIR	Méthode non destructive, semi-quantitative, identification des EPS, applicable sur des échantillons hydratés	Ne permet pas d'étudier la composition spatiale, la pénétration du rayonnement IR est de 0,5 et 5 µm	(Humbert and Quilès 2011; Pan et al. 2016; Olwal et al. 2017)
Microscopie à force atomique (AFM)	Balayage de la surface avec une pointe très fine, ce qui permet d'étudier la topologie de surface	<i>in-situ</i>	Heures ou jours	Microscope AFM	Haute résolution, non destructive, visualisation de la surface, mesure des forces d'adhésion, analyse qualitative d'EPS (marqueurs)	Analyse d'une petite zone, échantillon doit être immobilisé, après analyse dommages de l'échantillon	(Azeredo et al. 2017; Pires et al. 2017)

Annexe 2: Méthodes d'extraction des EPS de biofilms (Pan et al. 2016)

	Techniques d'extraction	Avantages	Limitations
Méthodes physiques	Chaleur	Efficace	Induit des hydrolyses d'EPS, lyse cellulaire
	Vapeur	Rendement élevé de protéines, peu de lyse cellulaire	Libération d'une quantité significative d'hexoses
	Centrifugation	Efficace, peu de lyse cellulaire	Rendement faible d'extraction des EPS (notamment des petites protéines), peu d'efficacité sur les EPS liés
	Ultra-sonication	Rendement très élevé de protéines	Dégradation inefficace de composé
Méthodes chimiques	EDTA	Rendement élevé d'EPS	Récupération de peu de protéines et carbohydrates, modification des EPS
	CER	Efficace, peu de lyse cellulaire, riche en protéine	Récupération de peu d'ADN extracellulaire
Méthodes combinées	Formaldéhyde + NaOH	Efficace, peu de mortalité	Non sensible aux polysaccharides, réagis avec les groupements amines (protéines et ADN)
	Centrifugation + Formaldéhyde	Rendement élevé pour la récupération des carbohydrates	Réagis avec les EPS

Annexe 3: Marqueurs fluorescents des composés de la matrice des biofilms couramment utilisés en microscopie confocale à balayage laser

EPS ciblé	Marqueur	Motifs marqués	Polymère détecté	Autre	Références
Polysaccharides	Calcofluor blanc	β 1-3 et β 1-4 monomères de glucose	Cellulose, chitine	/	(Schlafer and Meyer 2017)
	Wheat Germ Agglutinine (WGA)	N-acétylglucosamine	Peptidoglycane, chitine, acide sialique	/	(Strathmann et al. 2002; Amine Ben Mlouka et al. 2016)
	Concavaline A (ConA)	α -D-glucose, α -D-mannose, N-acétylglucosamine	alginate, levane	/	(Strathmann et al. 2002; Amine Ben Mlouka et al. 2016; Pan et al. 2016; Neu and Kuhlicke 2017)
	Aleuria aurantina lectin (AAL)	α -D-fructose	levane	/	(Tawakoli et al. 2017)
	Carbohydrate binding module (GFP- CBM3)		Cellulose, xylane, chitine	/	(Nguyen et al. 2014; Schlafer and Meyer 2017)
Protéines	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Amine primaire	Protéine non spécifique	Fluorescence très limitée en milieu basique	(Hermanson 2013)
	SyproRuby (FilmTracer)	Amine (acide aminé basique)	Protéine non spécifique		(Peixoto 2011; Schlafer and Meyer 2017)
	Epicoconone	Amine	Protéine non spécifique	Liaison réversible	(Coghlan et al. 2005; Peixoto 2011)
	Rouge congo	Feuillet β	Fibres amyloides		(Groenning 2010; Schlafer and Meyer 2017)
	Thioflavin T	Feuillet β	Fibres amyloides	Peu spécifique, se lie à l'ADN	(Ilanchelian and Ramaraj 2004; Groenning 2010; Schlafer and Meyer 2017)
	Anticorps monoclonaux	Spécifique de l'anticorps choisi	Spécifique		(Schlafer and Meyer 2017)
ADN	DAPI	Liaison bases A-T de l'ADN		perméant	(Pan et al. 2016)
	Phénanthrines : -Ethidium bromide -Propidium iodide	Intercalant ADN	ADN/ARN	Perméant impermeant	(Pan et al. 2016)
	Acridine orange	Intercalant ADN	ADN	perméant	(Pan et al. 2016)
	Cyanines primaires : Picogreen SYBR Green	Intercalant ADN	ADN double brin	perméant	(Okshevsky and Meyer 2014; Schlafer and Meyer 2017)
	Dimères de cyanines : TOTO, YOYO, etc..	Intercalant ADN	ADN simple et double brin	Impermeant	(Okshevsky and Meyer 2014; Schlafer and Meyer 2017)
	Monomère de cyanines : TO-PRO	Intercalant ADN	ADN double brin	Impermeant, lie ADN simple brin et ARN en émettant peu de fluorescence	(Schlafer and Meyer 2017)
	Cyanines perméables : SYTO 9,60 etc.	Intercalant ADN	Dépend du marqueur	perméant	(Pan et al. 2016)

Annexe 4: Référence des réactifs utilisés

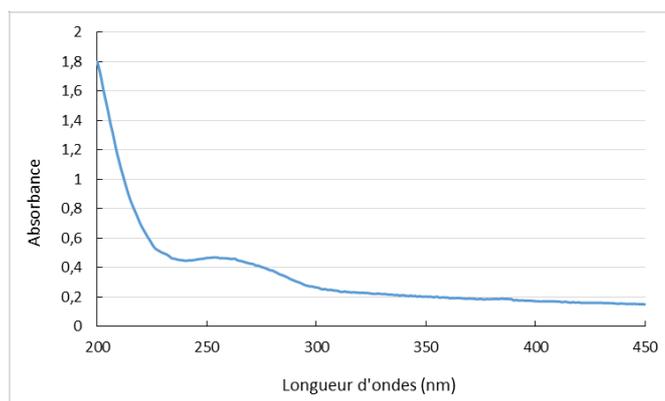
Nom du produit	Fournisseur	Référence
Tryptic Soy (TS)	Corning	61-411-RO
Luria bertani (LB)	Fisher	1201-7594
Luria Bertani (LB) Agar	Sigma-Aldrich	L2897
Man Rogosa Sharpe (MRS)	Biokar diagnostics	BK070KA
Man Rogosa Sharpe (MRS) agar	Biokar diagnostics	BK089HA
Plate Count Agar (PCA)	Biokar diagnostics	BK144
Agar bactériologique de type E	Biokar diagnostics	A1012 hA
Saccharose	Euromedex	200-301-B
PBS	Sigma-Aldrich	P5493
FluoroProfile® Protein Quantification Kit	Sigma-Aldrich	FP0010
TOTO™-1	Invitrogen™	T3600
Periodic Acid-Schiff (PAS) Kit	Sigma-Adrich	395B-1KT
Mowiol® 4-88	Sigma-Aldrich	81381
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Invitrogen™	P11496
Bromure d'édithium (BET)	Euromedex	EU 0071_A
Agarose	Sigma-Aldrich	A9539
Tris base	Sigma-Aldrich	93362
Acide borique	Sigma-Aldrich	B6768
Éthylènediaminetétraacétique (EDTA)	Sigma-Aldrich	E5134
SmartLadder	Eurogentec	MW-1700-10
Tampon PCR	Eurogentec	ME-0065-05
Chlorure de magnésium (MgCl ₂)	Eurogentec	ME-0065-05
Nucleotide tri-phosphates (dNTP)	Eurogentec	NU-0010-50
SilverStar DNA polymerase	Eurogentec	ME-0065-05
SmartLadder SF	Eurogentec	MW-1800-04
Kit DNeasy® Blood and Tissue	Qiagen	69504
iTaq universal SYBER Green supermix	Biorad	1725121
Ethidium mono-azide (EMA)	Biotium	40015
Propidium mono-azide (PMA)	Biotium	40013
Resazurin sodiumsalt	Sigma-Aldrich	R7017

Annexe 5: Avantages et inconvénients des méthodes de formation de biofilms modèles envisagées pour l'étude

	Membrane d'esters de cellulose (PALL GN-6 Metrical®)	Membrane Polycarbonate "blanche" (Isopore™ GTTP)	Membrane Polycarbonate "noire" (Isopore™ GTBP)	Microplaques 96 et 24 puits (96p : Greiner, Polystyrène)	Lamelle de verre en microplaque 24 puits (ThermoScientific, Polystyrène)
Type de biofilms formés	Aérien	Aérien	Aérien	Immergé	Immergé
Facilité de former des biofilms	++ Utilisation de système de filtration	++ Dépôt en spot / filtration	++ Dépôt en spot / filtration	+ Faible adhésion de <i>L. citreum</i>	+ Faible adhésion de <i>L. citreum</i>
Récupération cellulaire	++	++	++	- Difficulté de récupération au fond sur les parois des puits	+ Difficulté de récupérer la lamelle dans les puits
Adaptabilité aux traitements physiques (Jet de plasma et LED UV-C)	++	++	++	- Non utilisable pour le traitement plasma froid	+
Adaptabilité avec marqueurs fluorescents	Auto-fluorescence à différentes longueurs d'ondes	Auto-fluorescence à différentes longueurs d'ondes	+	+	+
Autres	Déjà utilisé pour un traitement par plasma froid (Marchalet al. 2012)			Formation de biofilm sur les parois des puits	

Annexe 6: Analyse spectrale du dextrane formé et purifié par la souche *L. citreum* B-1299

Le polymère de dextrane de *L. citreum* purifié avec le protocole de (Bounaix et al. 2009) a été remis en suspension à une concentration de 1g.L^{-1} . Un volume de $500\mu\text{L}$ de la solution est placé en micro-cuve en quartz, le spectre d'absorbance du polymère est ensuite réalisé de 250 nm à 400 nm avec une résolution de 1 nm (Genova de Jenway).



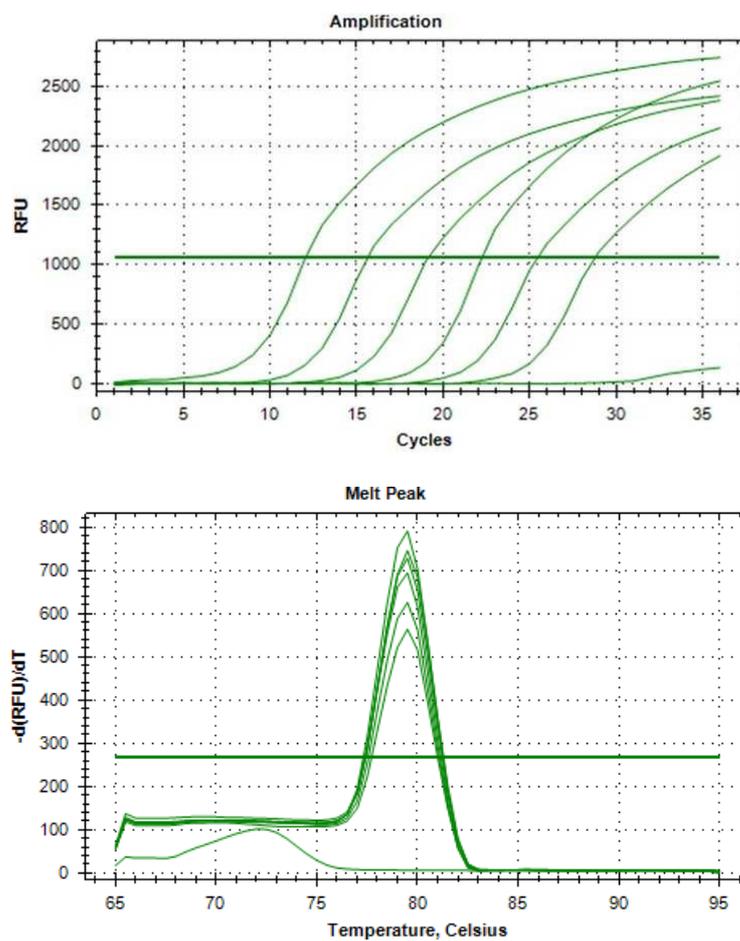
Spectre d'absorption dans l'UV du dextrane purifié (1g.L^{-1}) de *L. citreum*, réalisé avec spectrophotomètre GENOVA

Le polymère de dextranes produit par *L. citreum* a été analysé sur ses propriétés d'absorption des rayonnements UV notamment C. Le polymère purifié absorbe peu dans la zone de 250 nm à 300 nm.

Annexe 7: Résultats de qPCR

- A) Courbes d'amplification de l'ADN au cours des différents cycles de la qPCR; cycle seuil (Ct ou Cq) fixé à environ 1000 RFU pour chaque dilution.
- B) Courbe de fusion réalisée à la fin de l'amplification. La fluorescence est quantifiée en fonction d'une variation de température de 65 à 95°C.

Dans la figure ci-dessous, le premier pic ($T_m=72^\circ\text{C}$) correspond à une dimérisation des amorces (échantillon témoin ne comportant pas d'ADN matrice), le second pic ($T_m=79^\circ\text{C}$) correspond aux amplicons spécifiques générés.



Annexe 8: Composition du milieu TS

Milieux	Trypticase Soja (TS)
Composition	Peptone d'origine non-animale : 20 g.L ⁻¹ Dextrose: 2,5 g.L ⁻¹ NaCl: 5 g.L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ : 2,5 g.L ⁻¹
	Agar 15 g.L ⁻¹

