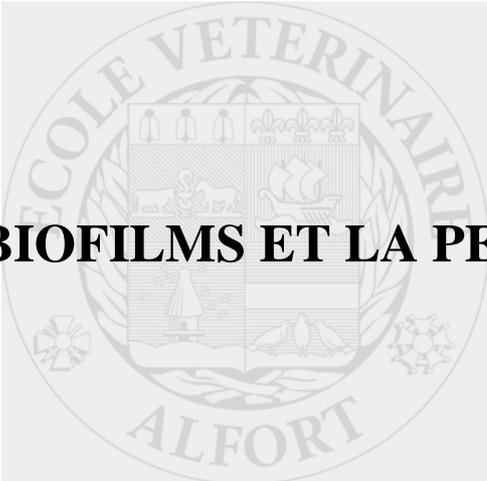


ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

---

Année 2009



**LES BIOFILMS ET LA PEAU**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le 8 Octobre 2009

par

**Alice de CHALVET de ROCHEMONTEIX**

Née le 28 Mars 1985 à Paris (Seine)

JURY

**Président : M. ...**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL**

**Membres**

**Directeur : Mme Geneviève Marignac**

**Maître de conférences en Parasitologie et Maladies Parasitaires à l'ENVA**

**Assesseur : Mr Henri-Jean Boulouis**

**Professeur dans l'Unité de Pathologie Générale, Microbiologie et Immunologie à l'ENVA**

**Invité : Mr Blaise Hubert**



**LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires : MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, LE BARS Henri,

MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques.

**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)**

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

|   |  |
|---|--|
| <p><b>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b><br/>Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur<br/>M. DEGUEURCE Christophe, Professeur<br/>Mme ROBERT Céline, Maître de conférences<br/>M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b><br/>Mme QUINTIN-COLONNA François, Professeur*<br/>M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur<br/>M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b><br/>Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur*<br/>M. TIRET Laurent, Maître de conférences<br/>Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b><br/>Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur<br/>M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*<br/>M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE BIOCHIMIE</b><br/>M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences*<br/>M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences</p> | <p><b>- UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b><br/>M. CRESPEAU François, Professeur<br/>M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur*<br/>Mme BERNEX Florence, Maître de conférences<br/>Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE VIROLOGIE</b><br/>M. ELOIT Marc, Professeur*<br/>Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE</b><br/>M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur<br/>Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p><b>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b><br/>M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> <p><b>- DISCIPLINE : ANGLAIS</b><br/>Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p><b>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</b><br/>M. PHILIPS, Professeur certifié</p> |
|---|--|

**DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES BOVIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)**

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

|   |  |
|---|--|
| <p><b>- UNITE DE MEDECINE</b><br/>M. POUHELON Jean-Louis, Professeur*<br/>Mme CHETBOUL Valérie, Professeur<br/>M. BLOT Stéphane, Professeur<br/>M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences<br/>Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences<br/>Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b><br/>M. DENOIX Jean-Marie, Professeur<br/>M. AUDIGIE Fabrice, Professeur*<br/>Mme GRAUDET Aude, Praticien hospitalier<br/>Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel<br/>Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b><br/>(rattachée au DPASP)<br/>M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences<br/>M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences*<br/>M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)<br/>M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences<br/>Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP)<br/>Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p><b>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</b><br/>Mme Françoise ROUX, Maître de conférences contractuel</p> | <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b><br/>M. FAYOLLE Pascal, Professeur*<br/>M. MOISSONNIER Pierre, Professeur<br/>M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences<br/>M. NIEBAUER Ger, Professeur contractuel<br/>Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences<br/>Mme RAVARY-PLUMIOEN Béatrice, Maître de conférences (rattachée au DPASP)<br/>M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel<br/>M. JARDEL Nicolas, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE</b><br/>Mme BEGON Dominique, Professeur*<br/>Mme STAMBOULI Founa, Praticien hospitalier</p> <p><b>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</b><br/>Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b><br/>M. CHERMETTE Renaud, Professeur*<br/>M. POLACK Bruno, Maître de conférences<br/>M. GUILLOT Jacques, Professeur<br/>Mme MARGNAC Geneviève, Maître de conférences<br/>Mme HALOS Lénig, Maître de conférences<br/>M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p><b>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT</b><br/>M. GRANDJEAN Dominique, Professeur*<br/>Mme YAGUYAN-COLLARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</b><br/>M. PARAGON Bernard, Professeur</p> |
|---|--|

**DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)**

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

|   |   |
|---|---|
| <p><b>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b><br/>M. BENET Jean-Jacques, Professeur*<br/>Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Professeur<br/>Mme DUFOUR Barbara, Professeur</p> <p><b>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b><br/>M. BOLNOT François, Maître de conférences*<br/>M. CARLIER Vincent, Professeur<br/>Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences<br/>M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> | <p><b>- UNITE DE ZOOTECNIE, ECONOMIE RURALE</b><br/>M. COURREAU Jean-François, Professeur<br/>M. BOSSE Philippe, Professeur<br/>Mme GRMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur<br/>Mme LEROY Isabella, Maître de conférences<br/>M. ARNE Pascal, Maître de conférences<br/>M. PONTER Andrew, Professeur*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b><br/>M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences<br/>Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP)<br/>M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences<br/>M. ADJOU Karim, Maître de conférences*</p> |
|---|---|

\* Responsable de l'Unité



## **REMERCIEMENTS**

**Au Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil,**

Pour nous avoir fait honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

**A Madame Geneviève MARIGNAC,**

Maître de Conférences en Dermatologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter l'encadrement de ce travail.

Pour sa rigueur, ses conseils, sa compétence et sa disponibilité dans la réalisation de ce travail.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Très sincères remerciements.

**A Monsieur Henri-Jean BOULOUIS,**

Professeur de Bactériologie et d'Immunologie Générale à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour avoir eu la gentillesse de corriger ce travail et de participer à notre jury de thèse.

Remerciements respectueux.

**A Monsieur Blaise HUBERT,**

Praticien hospitalier dans le service de Dermatologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour ses nombreux conseils, son soutien et son enthousiasme,

Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Remerciements respectueux.

**A Monsieur TOUTAIN,**

Professeur de Physiologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, sans qui ce passionnant sujet de thèse n'aurait pu voir le jour.

Sincères remerciements.



**A mes parents, Géraud et Françoise,**

Pour avoir toujours su me montrer les valeurs essentielles,

Pour leur soutien sans faille.

**A mon frère Matthieu,**

Pour son humour et sa vivacité d'esprit,

Pour qu'il soit fier de sa grande sœur !

(Et pour lui prouver qu'on trouve aussi des biofilms sur les percheros !!!)

**A mes amis de Stanislas, d'Henri IV, d'Alfort et d'ailleurs,**

Pour tous ces bons moments passés ensemble et ceux à venir,

Pour tous ces fous rires,

Pour toutes ces discussions interminables où le monde est à refaire,

Pour qu'ils réalisent que les biofilms... sont partout!

**A mes professeurs de classe préparatoire du Lycée Henri IV,**

Pour leur dynamisme et leur soutien pendant ces deux années difficiles, mais tellement enrichissantes.

**A Oxford, le plus beau des cockers.**



« Il y a dans le regard des bêtes une lumière profonde et doucement triste qui m'inspire une telle sympathie que mon âme s'ouvre comme un hospice à toutes les douleurs animales. »

Francis Jammes



# TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1. METHODES D'ETUDES DES BIOFILMS.....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.1. DONNEES HISTORIQUES .....   | 7         |
| 1.2. DIVERSITE DES BIOFILMS ET DIVERSITE DES METHODES D'ETUDES.....                                    | 8         |
| 1.3. LES METHODES D'ETUDE DES BIOFILMS .....   | 9         |
| 1.3.1. CHOIX DES MICRO-ORGANISMES.....   | 9         |
| 1.3.2. LA POLYCULTURE : MEILLEUR REFLET DE LA REALITE BIOLOGIQUE.....                                  | 9         |
| 1.3.3. LES DIFFERENTES METHODES D'OBTENTION DES BIOFILMS.....  | 10        |
| 1.3.4. LES DIFFERENTES METHODES D'OBSERVATION DES BIOFILMS.....  | 11        |
| 1.4. ETUDES DE LABORATOIRE VERSUS ETUDES DE TERRAIN.....   | 14        |
| 1.5. LE MICRO-ORGANISME LE PLUS ETUDIE EN MONOCULTURE : <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....            | 14        |
| 1.6. ETABLISSEMENT DE MODELES D'INFECTIONS ASSOCIES A DES BIOFILMS .....                               | 15        |
| 1.6.1. MODELES IN VITRO.....   | 15        |
| 1.6.2. MODELES ANIMAUX <i>IN VIVO</i> .....  | 16        |
| <b>2. STRUCTURE DES BIOFILMS .....</b>   | <b>17</b> |
| 2.1. UNE GRANDE DIVERSITE DE BIOFILMS .....  | 17        |
| 2.2. UNE ORGANISATION STRUCTURALE COMMUNE.....   | 19        |
| 2.2.1. UNE ORGANISATION STRATIFIEE.....  | 19        |
| 2.2.2. LES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DU BIOFILM : LES BACTERIES ET LA MATRICE D'EXOPOLYSACCHARIDES ..... | 20        |
| 2.3. OBSERVATION DE BIOFILMS .....   | 20        |
| <b>3. FORMATION ET ECOLOGIE DES BIOFILMS .....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1. LES ETAPES DE FORMATION D'UN BIOFILM .....  | 23        |
| 3.1.1. ATTACHEMENT PRIMAIRE REVERSIBLE ET NON SPECIFIQUE A UNE SURFACE (ADHERENCE).....                | 24        |
| 3.1.2. ATTACHEMENT SECONDAIRE IRREVERSIBLE ET SPECIFIQUE A UNE SURFACE (ADHESION).....                 | 25        |
| 3.1.3. PHASES PRECOCES DE DEVELOPPEMENT DU BIOFILM. MATURATION DU BIOFILM. ....                        | 27        |
| 3.1.4. ESSAIMAGE ET DISPERSION DU BIOFILM .....  | 27        |
| 3.2. FACTEURS FAVORISANT LA FORMATION D'UN BIOFILM.....  | 28        |
| 3.2.1. CARACTERISTIQUES DE LA SURFACE .....  | 28        |
| 3.2.2. CARACTERISTIQUES DU MILIEU .....  | 30        |
| 3.2.3. PROPRIETES DES CELLULES .....   | 31        |
| 3.2.4. CONCLUSION : LES FACTEURS INFLUANT SUR LA FORMATION DE BIOFILMS .....                           | 32        |
| 3.3. FACTEURS FAVORISANT LA DISPERSION D'UN BIOFILM .....  | 33        |
| 3.4. ECOLOGIE D'UN BIOFILM .....   | 34        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. REGULATION DE LA FORMATION DES BIOFILMS .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.1. LE QUORUM SENSING .....</b>  | <b>35</b> |
| 4.1.1. LE QUORUM SENSING. DEFINITION ET MECANISMES.....  | 35        |
| 4.1.2. LES MOLECULES DU QUORUM SENSING .....   | 35        |
| 4.1.3. ROLES DU QUORUM SENSING .....   | 36        |
| 4.1.4. ALTERATION DU QUORUM SENSING. CONSEQUENCES .....  | 36        |
| 4.1.5. INTERACTION DU QUORUM SENSING AVEC D'AUTRES MOLECULES : EXEMPLE DE LA LACTOFERRINE .....  | 37        |
| <b>4.2. REGULATION GENETIQUE PAR LES CELLULES FIXEES.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>4.3. REGULATION DE LA FORMATION DES BIOFILMS PAR LE GMP-C .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>4.4. REGULATION DE LA FORMATION DES BIOFILMS PAR L'ACETYL PHOSPHATE ET L'ALARMONE : REGULATION DE L'EXPRESSION DE CERTAINS GENES EN FONCTION DES CONDITIONS NUTRITIONNELLES .....</b> | <b>38</b> |
| <b>4.5. AUTRES MECANISMES REGULATEURS DE LA FORMATION DE BIOFILMS.....</b>   | <b>38</b> |
| <br>   |           |
| <b>5. LES BIOFILMS DANS LEUR ENVIRONNEMENT .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>5.1. AVANTAGES CONFERES PAR LE MODE DE VIE EN BIOFILM .....</b>   | <b>40</b> |
| 5.1.1. AVANTAGES METABOLIQUES.....   | 40        |
| 5.1.2. PROTECTION DES MICRO-ORGANISMES DU BIOFILM .....  | 41        |
| <b>5.2. BIOFILMS ET ADAPTATIONS AUX CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES.....</b>  | <b>42</b> |
| 5.2.1. BIOFILMS ET STRESS ENVIRONNEMENTAL : ACTIVATION DU FACTEUR $\Sigma$ RPOS.....   | 42        |
| 5.2.2. RESISTANCE AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX : BIOFILMS HOMOGENES ET BIOFILMS HETEROGENES .....   | 43        |
| <br>   |           |
| <b>6. IMPORTANCE DES BIOFILMS .....</b>  | <b>45</b> |
| <b>6.1. FLORE COMMENSALE ET PROTECTION DE L'ORGANISME .....</b>  | <b>45</b> |
| 6.1.1. FLORE COMMENSALE CUTANEE.....   | 45        |
| 6.1.2. FLORE COMMENSALE DU TRACTUS DIGESTIF .....  | 46        |
| <b>6.2. IMPORTANCE MEDICALE DES BIOFILMS.....</b>  | <b>49</b> |
| 6.2.1. BIOFILMS ET INFECTIONS CHRONIQUES .....   | 49        |
| 6.2.1.1. Biofilms et santé publique.....   | 49        |
| 6.2.1.2. Infections liées à la présence de biofilms.....   | 49        |
| 6.2.1.3. Epidémiologie. Facteurs favorisant le développement d'infections dûes à des biofilms .....  | 50        |
| 6.2.1.4. Biofilms et infections chroniques : Mécanismes.....   | 51        |
| 6.2.1.5. Infections chroniques liées à la présence de biofilms. Etude de quelques exemples .....   | 55        |
| 6.2.2. BIOFILMS ET IMPLANTS MEDICAUX .....   | 57        |
| 6.2.2.1. Biofilms et infections du tractus urinaire .....  | 58        |
| 6.2.2.1.1. Pathogénie et micro-organismes impliqués.....   | 58        |
| 6.2.2.1.2. Formation de biofilms cristallins. Complications .....  | 60        |
| 6.2.2.2. Biofilms et cathéters veineux centraux.....   | 62        |
| 6.2.2.3. Biofilms et valves cardiaques artificielles.....  | 64        |
| 6.2.2.4. Biofilms et ostéomyélite .....  | 65        |
| 6.2.2.5. Biofilms et prothèses oculaires .....   | 65        |
| 6.2.2.6. Conclusion : biofilms et infections nosocomiales liées au port d'implant.....   | 66        |

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| 6.2.3.        | BIOFILMS ET MEDECINE VETERINAIRE.....  | 68        |
| 6.2.3.1.      | Biofilms et transmission vectorielle d'agent pathogène par un vecteur biologique.....                  | 68        |
| 6.2.3.2.      | Biofilms et infections nosocomiales chez les animaux.....  | 69        |
| 6.2.4.        | BIOFILMS ET ANTIBIORESISTANCES.....  | 70        |
| 6.2.4.1.      | Facteurs de résistance innés.....  | 70        |
| 6.2.4.2.      | Facteurs de résistance induits.....  | 75        |
| 6.2.4.3.      | Moyens de lutte contre les antibiorésistances des biofilms.....  | 75        |
| <b>6.3.</b>   | <b>IMPORTANCE INDUSTRIELLE DES BIOFILMS.....</b>   | <b>76</b> |
| 6.3.1.        | EFFETS BENEFIQUES DE LA PRESENCE DE BIOFILMS.....  | 76        |
| 6.3.2.        | EFFETS NEFASTES DE LA PRESENCE DE BIOFILMS.....  | 78        |
| 6.3.2.1.      | Biofilms et santé publique.....  | 78        |
| 6.3.2.2.      | Biofilms, dégradations et impact économique.....   | 79        |
| 6.3.2.3.      | Moyens de lutte.....   | 79        |
| <b>7.</b>     | <b><u>MOYENS DE LUTTE CONTRE LES BIOFILMS.....</u></b>   | <b>80</b> |
| <b>7.1.</b>   | <b>EMPECHER LA FORMATION DE BIOFILMS.....</b>  | <b>80</b> |
| 7.1.1.        | TECHNIQUES COURAMMENT UTILISEES.....   | 80        |
| 7.1.2.        | LES NOUVELLES TECHNOLOGIES AU SERVICE DE LA LUTTE CONTRE LES BIOFILMS.....                             | 81        |
| <b>7.2.</b>   | <b>ELIMINER DES BIOFILMS DEJA FORMES.....</b>  | <b>82</b> |
| <b>7.2.1.</b> | <b>TECHNIQUES D'ELIMINATION DES BIOFILMS COURAMMENT UTILISEES.....</b>                                 | <b>82</b> |
| 7.2.1.1.      | Elimination mécanique du biofilm.....  | 82        |
| 7.2.1.2.      | Antibiothérapie.....   | 83        |
| <b>7.2.2.</b> | <b>LES NOUVELLES TECHNOLOGIES AU SERVICE DE LA LUTTE CONTRE LES BIOFILMS.....</b>                      | <b>85</b> |
| <b>8.</b>     | <b><u>PROPOSITION DE VOIES DE RECHERCHE SUR LA PROBLEMATIQUE DES BIOFILMS EN DERMATOLOGIE.....</u></b> | <b>88</b> |
| <b>8.1.</b>   | <b>LA PEAU, INTERFACE ENTRE L'ORGANISME ET LE MILIEU EXTERIEUR.....</b>                                | <b>88</b> |
| 8.1.1.        | STRUCTURE DE LA PEAU.....  | 89        |
| 8.1.1.1.      | L'EPIDERME.....  | 90        |
| 8.1.1.1.1.    | Organisation structurale de l'épiderme.....  | 90        |
| 8.1.1.1.2.    | Importance du <i>stratum corneum</i> : l'« effet barrière ».....                                       | 95        |
| 8.1.1.2.      | LE DERME.....  | 96        |
| 8.1.1.3.      | L'HYPODERME.....   | 96        |
| 8.1.2.        | PROPRIETES ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA PEAU.....                                       | 96        |
| 8.1.2.1.      | LE PH CUTANE.....  | 96        |
| 8.1.2.2.      | LE FILM HYDROLIPIDIQUE.....  | 98        |
| 8.1.2.2.1.    | Composition.....   | 98        |
| 8.1.2.2.2.    | Rôles.....   | 100       |
| 8.1.2.3.      | LA FLORE CUTANEE.....  | 101       |
| 8.1.2.3.1.    | Composition et physiologie de la flore cutanée.....  | 101       |
| 8.1.2.3.2.    | Rôles de la microflore cutanée.....  | 102       |

|  |                   |
|--|-------------------|
| <b>8.2. BIOFILMS ET PEAU .....</b>   | <b>103</b>        |
| <b>8.2.1. BIOFILMS ET CICATRISATION. EXEMPLE DES PLAIES CHRONIQUES. ....</b>                             | <b>105</b>        |
| <b>8.2.1.1. PATHOGENIE .....</b>   | <b>105</b>        |
| <b>8.2.1.2. COMMENT EXPLIQUER LA CHRONICITE DE CES PLAIES ?.....</b>                                     | <b>106</b>        |
| <b>8.2.2. DERMATITE ATOPIQUE ET BIOFILMS .....</b>   | <b>108</b>        |
| <b>8.2.2.1. LA DERMATITE ATOPIQUE SECHE : DEFINITION ET TRAITEMENTS ACTUELS .....</b>                    | <b>108</b>        |
| 8.2.2.1.1. Etiopathogénie de la dermatite atopique.....  | 108               |
| 8.2.2.1.2. Traitements actuels de la dermatite atopique.....   | 110               |
| 8.2.2.1.2.1. Avantages et inconvénients des divers traitements .....                                     | 110               |
| 8.2.2.1.2.2. Démarche thérapeutique fréquemment mise en place .....                                      | 110               |
| <b>8.2.2.2. DERMATITE ATOPIQUE SECHE ET BIOFILMS .....</b>   | <b>111</b>        |
| <b>8.2.2.3. PROBLEMATIQUE POSEE PAR LA DERMATITE ATOPIQUE EN MATIERE DE STRATEGIE THERAPEUTIQUE ....</b> | <b>114</b>        |
| <b>8.2.2.4. PROPOSITION D'UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE POUR LA DERMATITE ATOPIQUE .....</b>      | <b>115</b>        |
| <b>8.2.3. ACNE ET BIOFILMS .....</b>   | <b>116</b>        |
| <b>8.3. APPLICATION A LA PRESCRIPTION DE TOPIQUES EN DERMATOLOGIE. PISTES DE REFLEXION. ....</b>         | <b>117</b>        |
| <b>8.3.1. PRESCRIPTION RAISONNEE D'UN TOPIQUE EN DERMATOLOGIE .....</b>                                  | <b>117</b>        |
| <b>8.3.1.1. FACTEURS DEPENDANTS DE LA DERMATOSE .....</b>  | <b>117</b>        |
| <b>8.3.1.2. FACTEURS DEPENDANTS DE L'INDIVIDU .....</b>  | <b>118</b>        |
| <b>8.3.1.3. FACTEURS DEPENDANTS DE LA NATURE DE LA MOLECULE .....</b>                                    | <b>118</b>        |
| 8.3.1.3.1. Capacité de pénétration cutanée.....  | 118               |
| 8.3.1.3.2. pH de la molécule.....  | 119               |
| 8.3.1.3.3. Pouvoir irritant .....  | 119               |
| <b>8.3.1.4. DUREE DU TRAITEMENT.....</b>   | <b>120</b>        |
| <b>8.3.1.5. CONCLUSION : PRESCRIRE UN TOPIQUE DE FAÇON RAISONNEE.....</b>                                | <b>120</b>        |
| <b>8.3.2. PROPOSITIONS DE VOIES DE RECHERCHE SUR LA PROBLEMATIQUE DES BIOFILMS EN DERMATOLOGIE .....</b> | <b>121</b>        |
| <b><u>CONCLUSION.....</u></b>  | <b><u>123</u></b> |
| <b>Liste des tableaux .....</b>  | <b>125</b>        |
| <b>Liste des figures.....</b>  | <b>126</b>        |
| <b>Liste des photographies.....</b>  | <b>128</b>        |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>  | <b>129</b>        |
| <b>Annexe : Article de synthèse .....</b>  | <b>141</b>        |

# INTRODUCTION

Un biofilm est une **communauté de micro-organismes** (bactéries, champignons, protozoaires ou algues) adhérant entre eux et fixés à une surface, et enrobés dans une matrice d'exopolysaccharides protectrice et adhésive qu'ils synthétisent.

Le mode de vie en biofilm est le **mode de comportement prédominant** des organismes unicellulaires. L'autre alternative est la flottaison libre de type dit "planctonique", dans un milieu liquide, fluide ou même solide. Les biofilms sont observés dans les milieux aqueux ou exposés à l'humidité. Ils peuvent se développer sur n'importe quel type de surface naturelle ou artificielle, qu'elle soit minérale (roche, interfaces air-liquide...), organique (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielle (canalisations, coques des navires) ou médicale (prothèses, cathéters, sondes urinaires....)

L'organisation communautaire des biofilms permet aux cellules de coopérer et d'interagir de manière différente qu'en environnement libre. Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe, régulé par de nombreux facteurs exogènes et endogènes. Il est caractérisé par un **changement radical de phénotype** et par l'acquisition de propriétés spécifiques aux biofilms, notamment l'acquisition d'une **antibiorésistance** et l'expression de facteurs de résistance à de nombreux stress environnementaux. Ceci pose de graves problèmes de santé publique, y compris parce que les biofilms peuvent se former sur des implants médicaux et être à l'origine d'**infections nosocomiales**. On trouve aussi des biofilms à la surface de la peau. La plupart du temps, ils sont composés de micro-organismes faisant partie de la flore commensale cutanée. Au-delà des problèmes de résistance, les biofilms cutanés sont impliqués dans de nombreux phénomènes comme l'homéostasie cutanée, la cicatrisation et dans le développement de dermatoses. Peu de données sont disponibles à ce sujet.

Le but de cette étude est de proposer des axes de recherche sur la problématique des biofilms en dermatologie et d'aboutir à l'élaboration de principes fondamentaux permettant une prescription cohérente et raisonnée de topiques dans le cadre d'une consultation de dermatologie humaine ou vétérinaire.

Au préalable, on présentera la physiologie des biofilms ainsi que les exemples de biofilms les plus fréquemment rencontrés dans le milieu médical et industriel, puis on étudiera les principaux moyens de lutte. Ensuite, nous étudierons la relation entre les biofilms et la peau et leur impact dans les principales dermatoses de l'Homme et de l'animal.



# **1. METHODES D'ETUDES DES BIOFILMS**

## **1.1. Données historiques**

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de micro-organismes à la surface des dents (Donlan, 2002).

La mise en évidence des biofilms est longtemps restée anecdotique, en partie parce que les méthodes d'observation n'étaient pas suffisamment performantes.

En 1933, lors d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium, Henrici observa, fixées sur ces lames, des communautés bactériennes. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieux aqueux sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface, et non pas sous forme planctonique (Henrici, 1933). Le concept de « biofilm » est né, mais le terme en lui-même n'est pas encore utilisé.

Claude E. Zobell (1904-1989), considéré comme le père de la microbiologie marine, démontra vers 1936 que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué. En 1943, il montra que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation de communautés bactériennes fixées sur les surfaces (Costerton, 2004).

C'est dans les années 1970, sous l'impulsion de Characklis puis de Costerton, que l'étude des biofilms a pris véritablement son essor. Les techniques utilisées à cette époque étaient essentiellement la microscopie électronique à balayage et les cultures microbiologiques. Ces techniques ont permis de définir un certain nombre de caractéristiques inhérentes aux biofilms. Par exemple, l'utilisation d'un colorant spécifique des polysaccharides, le rouge Ruthenium, couplée à un fixateur, le tétraxide d'osmium, a permis de visualiser une matrice d'exopolymères englobant des agrégats cellulaires.

En 1973, Characklis démontre que les matrices d'exopolymères des biofilms confèrent à ces derniers une résistance avérée contre l'action des désinfectants, notamment ceux à base de chlore (Characklis, 1973). En 1978, Costerton et son équipe proposèrent les premières

hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes. Ils proposèrent pour la première fois le terme de « biofilms », en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes (Costerton, 1978). Cette proposition, qui s'appuyait initialement sur la comparaison du nombre de bactéries sous forme planctonique et sous forme de biofilms dans une rivière, est désormais généralement admise par les microbiologistes.

Depuis, un nombre croissant d'études ont été consacrées aux biofilms, aussi bien dans les domaines industriel et environnemental que dans le domaine médical. En dix ans, le nombre de publications scientifiques annuelles consacrées aux biofilms est passé d'une dizaine (1996) à plus de 1200 (2006).

Plus récemment, la microscopie à balayage (cf page 11) et les cultures ont été supplantées par d'autres techniques comme la microscopie confocale à balayage laser (cf page 11) et les outils du génie génétique. Ces derniers sont par exemple applicables à l'étude des gènes impliqués dans l'adhésion et la formation du biofilm (Donlan, 2002).

## **1.2. Diversité des biofilms et diversité des méthodes d'études.**

Les **techniques d'études des biofilms** sont très **variées**. Cela est à mettre en relation avec la multitude des environnements dans lesquels les biofilms peuvent se former : pipelines, cathéters, dents, peau, racines des plantes, poumons (par exemple en cas de mucoviscidose, etc...). Cependant, même si les biofilms sont extrêmement diversifiés, il est utile de mettre en place des méthodes d'étude reproductibles d'un laboratoire à un autre, afin de pouvoir comparer les données et les interpréter correctement (MacLean, 2004).

### **1.3. Les méthodes d'étude des biofilms**

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

#### **1.3.1. Choix des micro-organismes**

Le choix des micro-organismes utilisés pour étudier la formation de biofilms repose sur plusieurs critères (MacLean, 2004) :

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

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

#### **1.3.2. La polyculture : meilleur reflet de la réalité biologique**

La grande majorité des études sur les biofilms sont réalisées en **monoculture**, c'est-à-dire que l'on étudie des biofilms formés d'une seule espèce de micro-organismes. L'**avantage** de la monoculture est que l'on peut plus facilement **identifier des mutations** survenues lors du changement de l'aspect des colonies (MacLean, 2004).

Néanmoins, dans la nature, les micro-organismes sous forme de biofilms sont rarement trouvés sous forme de culture pure ; les biofilms hétérogènes composés de plusieurs espèces de micro-organismes sont prédominantes. D'où l'existence d'une seconde méthode d'étude, plus complexe à mettre en œuvre mais plus proche de la réalité biologique : la polyculture (Maclean, 2004). Certaines colonies de micro-organismes sont pigmentées, il est donc facile de les identifier lors de polycultures. Sinon, on peut identifier les espèces

microbiennes par les techniques du génie génétique (on met une sonde d'ADN spécifique d'une bactérie et l'hybridation *in situ* permettra d'identifier la bactérie concernée par fluorescence).

Les biofilms hétérogènes sont le siège d'un grand nombre d'interactions entre micro-organismes (cf page 22) : **actions synergiques, actions négatives** (compétition, parasitisme, prédation...).

Lorsque les populations bactériennes atteignent un certain équilibre au sein du biofilm, seul un petit nombre d'espèces bactériennes prédomine. Les organismes prédominants au sein des biofilms ne sont pas nécessairement les mêmes qui prédominent sous forme planctonique.

Ainsi, les études en laboratoire permettent d'évaluer quelles sont les espèces bactériennes qui deviennent prédominantes lors du changement des conditions environnementales (MacLean, 2004).

### 1.3.3. Les différentes méthodes d'obtention des biofilms

Des chercheurs ont développé différents **modèles de biofilms artificiels**, reproductibles d'un laboratoire à un autre (Lemon, 2008).

Les **cuves à flux continu** sont de petites chambres à parois transparentes dans lesquelles des biofilms submergés peuvent se former et sont continuellement approvisionnés en nutriments. Comme l'indique le nom de la technique, les biofilms sont dans un milieu aqueux, caractérisé par un flux de liquide, dont la vitesse est constante. Les biofilms formés dans ces cuves à flux continu peuvent être facilement observés avec les techniques de **microscopie confocale à balayage laser** (cf page 11) : on obtient ainsi des **images de biofilms à tous leurs stades de développement**. On peut observer des images de biofilms avec une structure « bourgeonnante » caractéristique, en forme de champignons séparés par des canaux aqueux.

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

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

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

#### **1.3.4. Les différentes méthodes d'observation des biofilms**

Les principales méthodes d'observation des biofilms sont la microscopie électronique à balayage et la microscopie confocale à balayage laser.

**La microscopie électronique à balayage** est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons-matière. Elle permet d'obtenir des images tridimensionnelles en haute résolution de la surface d'un échantillon. Le principe est d'envoyer un faisceau d'électrons<sup>1</sup> sur la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. Le premier microscope électronique fut commercialisé en 1965.

La vision en relief du microscope électronique à balayage permet une bonne observation des micro-organismes grâce à sa profondeur de champ, nettement plus élevée que celle des microscopes optiques. Mais progressivement, la microscopie électronique à balayage a été supplantée par la microscopie confocale à balayage laser.

---

<sup>1</sup> Un canon à électrons produit un **faisceau d'électrons**, appelé sonde électronique fine. Ce faisceau d'électrons est projeté sur l'échantillon à analyser. Cet échantillon, qui doit être propre, sec et conducteur, est placé sur une platine porte-objet. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon produit des électrons secondaires, de basse énergie, qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact, qui détermine le rendement en électrons secondaires, et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée. La cartographie d'électrons secondaires est enregistrée sous forme numérique. Avant les années 1980, on utilisait un tube cathodique couplée à une pellicule photographique (Colliex, 1998).

Le principe du **microscope confocal** fut décrit en 1953 par Minsky. Il faut attendre la fin des années 1980 pour que les premiers modèles commerciaux apparaissent, rendant cette technique accessible à de nombreux laboratoires. La microscopie confocale est très utilisée en biologie ainsi qu'en sciences des matériaux. Elle s'est récemment imposée comme moyen d'investigation volumique et temporelle de spécimens<sup>2</sup>.

Le principe de la microscopie confocale à balayage laser est de pratiquer des coupes optiques virtuelles de très faibles profondeurs de champs (environ 600 nm) dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans un plan donné, que l'on choisira. Une représentation tridimensionnelle du spécimen est obtenue par construction d'une pile de coupes sériées bidimensionnelles, se référant à des sections optiques dans des plans confocaux<sup>3</sup>. La figure 1 résume le mode de fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser. Le **rayon laser excitateur** pénètre dans l'échantillon préalablement marqué par des **fluorochromes**. Ces derniers sont auparavant répertoriés et choisis en fonction de leurs propriétés à se fixer sur des molécules particulières d'une structure ou d'un objet d'intérêt. Lors de l'impact optique, il y a émission de rayons lumineux provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable, appelé « pinhole<sup>4</sup> », il est possible de **sélectionner les rayons émis par un seul plan de préparation** et d'éliminer le signal provenant des autres plans. Les rayons réfléchis sont **filtrés en fonction de leurs longueurs d'onde** puis détectés par des photo-multiplieurs. Puis, le signal reçu est converti en signal numérique, contribuant à la création d'une image numérique virtuelle. Cette image est typiquement codée sur 8 bits, parfois sur 12 bits ou 16 bits. Chaque section optique est générée en déplaçant le faisceau laser sur une partie du domaine admissible de l'échantillon. La vitesse de balayage est limitée par l'inertie du système mécanique en mouvement. La profondeur du plan focal est ensuite modifiée finement grâce à un moteur contrôlé par ordinateur pour produire la séquence de sections<sup>5</sup>.

---

<sup>2</sup> <http://www.jouy.inra.fr>, <http://www.techno-science.net>

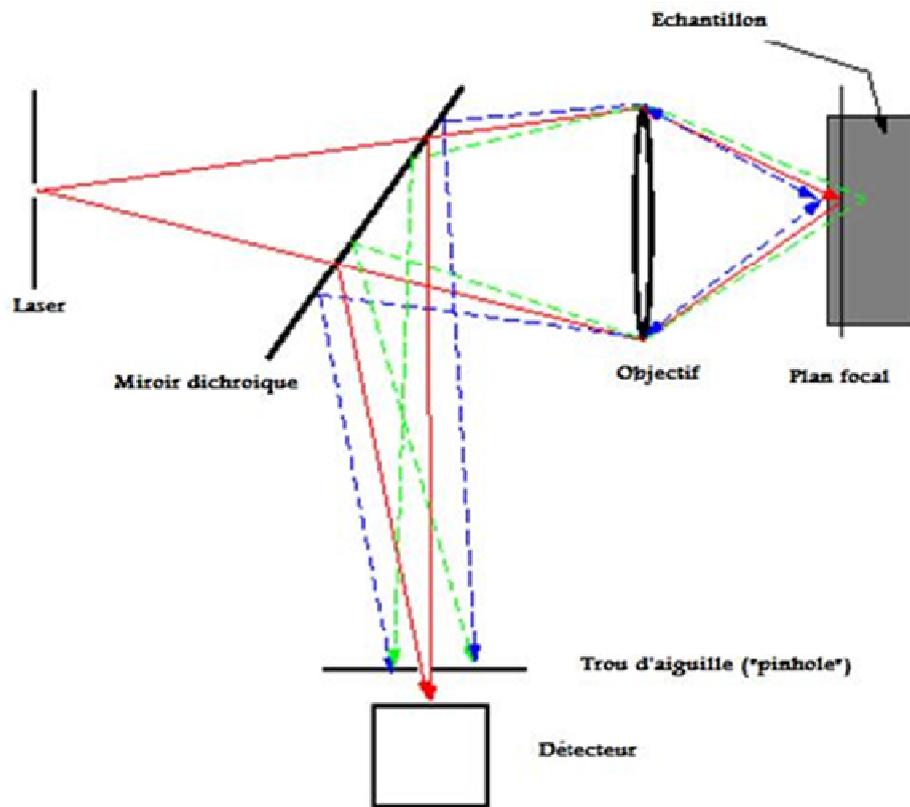
<sup>3</sup> <http://www.jouy.inra.fr>

<sup>4</sup> « pinhole » signifie « trou d'aiguille » en anglais

<sup>5</sup> <http://www.jouy.inra.fr>

## Figure 1: Principe de la microscopie confocale à balayage laser

D'après <http://www.jouy.inra.fr>



Les lasers utilisés le plus fréquemment sont les suivants<sup>6</sup> :

- argon-ion (longueurs d'onde : 457 nm, 488 nm, 514 nm),
- hélium-néon (543 nm),
- hélium-néon (633 nm).

La vision en relief permise par la microscopie électronique à balayage se prête bien à l'observation des micro-organismes, grâce à sa profondeur de champ. Les échantillons observés avec cette technique doivent néanmoins être préparés de façon rigoureuse, ce qui ne rend pas son utilisation très simple : tout échantillon doit être propre et sec avant d'être fixé. La microscopie confocale est plus facile d'utilisation. Elle permet des études sur du matériel

<sup>6</sup> <http://www.techno-science.net>

fixé, mais permet également d'étudier des phénomènes dynamiques, sur des cellules ou des **tissus vivants**, en particulier grâce à l'utilisation de molécules fluorescentes.

#### **1.4. Etudes de laboratoire versus études de terrain**

La plupart des études sur les biofilms sont menées **en laboratoire**. Elles sont complétées par des **études menées sur le terrain**, plus difficiles d'un point de vue logistique, mais plus proches des conditions réelles. Elles permettent de confirmer ou non les hypothèses émises par les laboratoires et de proposer des alternatives ou de nouvelles pistes de recherche.

La difficulté des études menées sur le terrain est d'ordre logistique. Les échantillons doivent être prélevés et stockés de la façon la plus stérile possible (MacLean, 2004).

#### **1.5. Le micro-organisme le plus étudié en monoculture : *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce la plus utilisée en laboratoire pour l'étude des biofilms et ce, pour plusieurs raisons.

Cette bactérie est rencontrée dans de nombreuses situations médicales (affections pulmonaires, brûlures, formation de biofilms sur des cathéters veineux centraux...). Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* se forment rapidement (moins de 24h), alors que des biofilms d'autres espèces (*Escherichia coli* par exemple) mettent au moins 48 heures à se former. Une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, PAO1, présente l'avantage d'avoir été entièrement séquencée, et sert donc de support à des études du génome (Maclean, 2004).

En plus de la standardisation des méthodes reproductibles d'un laboratoire à un autre, des modèles d'infections associées à des biofilms permettent la comparaison des résultats et la recherche de traitements possibles de ces infections.

## **1.6. Etablissement de modèles d'infections associés à des biofilms**

Les techniques d'étude des biofilms permettent de mettre en place des modèles d'infections associées aux biofilms, afin de mieux comprendre et de mieux traiter ces dernières. On distingue deux types de modèles : *in vitro* et *in vivo* (MacLean, 2004).

### **1.6.1. Modèles in vitro**

L'avantage des modèles *in vitro* est leur **bas prix** et le **contrôle des conditions expérimentales de croissance** des micro-organismes.

Voici quelques exemples de modèles *in vitro* d'infections liées à des biofilms, regroupés dans le tableau 1.

**Tableau 1: Modèles d'infection in vitro**

D'après (MacLean, 2004)

| <b>Technique</b>                          | <b>Objet d'étude</b>  |
|---|---|
| Cuve à flux continu (bouche artificielle) | Evaluation des techniques d'action des agents luttant contre la plaque dentaire |
| Sonde <i>in vitro</i>                     | Incrustation de la sonde urinaire par des cristaux                              |
| Fermenteur                                | Formation de biofilms oraux <i>in vitro</i>                                     |

Pour modéliser la formation du biofilm que constitue la plaque dentaire, on utilise un fermenteur, qui joue le rôle d'une véritable bouche artificielle. A l'intérieur de ce fermenteur sont disposés des disques d'hydroxyapatite préalablement recouverts de salive. Un système de lame rotative retire l'excédent de biomasse formée au niveau des disques d'hydroxyapatite (imite la mastication naturelle). Ceci permet de recréer *in vitro* les conditions environnementales retrouvées dans la cavité buccale et donc d'étudier les biofilms qui peuvent s'y former.

### 1.6.2. Modèles animaux *in vivo*

Toute infection est le reflet d'une interaction entre l'hôte et le micro-organisme responsable : d'où l'intérêt des **modèles animaux** pour étudier les maladies infectieuses liées à la présence de biofilms.

Les modifications génétiques réalisées chez les animaux de laboratoire (souris, rat, lapin...) permettent de **contrôler certains paramètres** (système immunitaire, physiologie...) et de **regarder l'influence de l'infection sur d'autres paramètres**, non fixés par l'expérimentateur.

Par exemple, l'étude des facteurs de virulence d'*Escherichia coli* chez le rat permet de réaliser un modèle animal de la prostatite chronique (MacLean, 2004). Une étude chez le lapin sur des biofilms d'*Escherichia coli* permet d'établir un modèle d'infection liée à la colonisation de sonde urinaire (MacLean, 2004). L'inconvénient de la réalisation de modèles animaux réside dans les problèmes d'éthique et de bien-être animal. De plus, on ne peut pas contrôler parfaitement tous les paramètres entrant en jeu dans l'étude. Enfin, les animaux de laboratoire sont loin de la réalité des espèces qui nous intéressent réellement.

Les méthodes d'étude des biofilms ont beaucoup évolué, en partie avec l'arrivée de la microscopie confocale et les outils du génie génétique. Leur standardisation a permis de réaliser des modèles d'infections associées à des biofilms, reproductibles d'un laboratoire à un autre. Elles connaissent un essor important depuis ces dix dernières années. Pour mieux comprendre ce que sont les biofilms et quelles sont les modalités de cette forme de vie, on va maintenant présenter de façon détaillée les particularités de leur architecture.

## **2. STRUCTURE DES BIOFILMS**

Dans les conditions naturelles, les bactéries existent sous deux formes (Clutterbuck, 2007) :

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

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

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

### **2.1. Une grande diversité de biofilms**

Le terme de biofilm pourrait laisser entendre qu'il s'agit d'une simple couche de micro-organismes déposée sur une surface. Les biofilms sont très **hétérogènes**, dans le temps et dans l'espace. Ils sont **constamment remodelés**, suite à l'influence permanente de facteurs endogènes et exogènes (cf page 28) (Tolker-Nielsen, 2000). Ils présentent une **grande diversité** aussi bien au niveau structural (une ou plusieurs espèces de micro-organismes au sein du biofilm, épaisseurs diverses) qu'au niveau des supports colonisés.

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

Les biofilms peuvent se former sur des **surfaces**, biologiques ou inertes, d'une **grande diversité** : tissus vivants, appareillage médical (sonde, cathéter, broches...), système de canalisation industriel ou d'eau potable, surfaces immergées... Les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle dans les mécanismes de formation du biofilm.

Selon le type de support sur lequel se forme le biofilm, l'organisation structurale de ce dernier sera différente. Un biofilm fixé dans la lumière d'une canalisation a une structure très complexe, et contient divers composants : produits issus de réactions de corrosion, boue, algues unicellulaires et bactéries filamenteuses. Un biofilm formé à la surface d'un cathéter a une organisation plus simple : on distingue des micro-colonies de coques associées à une matrice d'exopolymères (Donlan, 2002).

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

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

## **2.2. Une organisation structurale commune**

Les biofilms sont hétérogènes d'un point de vue structural. Ils se forment sur des supports variés, ont des épaisseurs différentes et sont formés par des espèces variées de micro-organismes. De cette diversité on peut néanmoins dégager **certaines caractéristiques structurales communes à tous les biofilms**. Un biofilm est constituée d'une fine monocouche de cellules à sa base (fixées à la surface du substrat), surmontée de plusieurs couches épaisses de cellules enfermées dans une matrice et reliées par des canaux aqueux. Il s'agit d'une **organisation spatiale stratifiée**, permettant des échanges (informations, nutriments...) et une coopération entre micro-organismes (Stoodley, 1997 ; Tolker-Nielsen, 2000).

### **2.2.1. Une organisation stratifiée**

La **couche la plus profonde du biofilm** est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente. La **couche superficielle du biofilm** est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide. Entre ces deux couches de cellules, on trouve des cellules en micro-aérobiose. L'organisation stratifiée des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments, d'ions... Les nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grande quantité dans les couches superficielles du biofilm. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont basses. Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des micro-organismes (Bury-Moné, 2007).

Des simulations tridimensionnelles réalisées par informatique ont permis de montrer que les zones de croissance rapide du biofilm sont caractérisées par la présence de larges structures en colonnes contrairement aux zones de croissance réduite où l'on trouve un réseau étroit de structures entraînant ainsi une réduction des communications intercellulaires et de la croissance du biofilm (Clutterbuck, 2007).

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

### 2.2.2. Les principaux constituants du biofilm : les bactéries et la matrice d'exopolysaccharides

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. L'eau est leur **principal composant**, ce qui explique leur propriété **hydrophile**. La présence de canaux et de pores permet des flux d'eau, d'ions et de nutriments (Clutterbuck, 2007).

Les micro-organismes représentent **2 à 15 %** du matériel du biofilm. La **matrice** extracellulaire représente **50 à 90%** de la masse organique carbonée d'un biofilm. Le rapport C/N d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice (Bury-Moné, 2007). La matrice d'exopolysaccharides joue un **rôle structural important**, et explique certains avantages permis par le mode de vie sessile, notamment la protection des micro-organismes contre les facteurs environnementaux et d'autres propriétés comme la résistance aux agents bactéricides.

Les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolysaccharides sont variables d'un biofilm à l'autre. Elle est toujours initialement composée de polysaccharides. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de **lutter contre la dessiccation** de certains biofilms dans le milieu naturel. Parfois, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001). La matrice d'exopolysaccharides joue aussi un rôle mineur dans les **propriétés d'antibiorésistance** des biofilms en se liant directement aux agents anti-microbiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (Donlan, 2002).

Ainsi, la matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de **barrière protectrice** contre la dessiccation, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages (Donlan, 2002).

### 2.3. Observation de biofilms

Les méthodes d'études actuelles des biofilms permettent d'en obtenir des images. Leur visualisation permet de mieux se rendre compte de la réalité et de la complexité de la structure des biofilms. Par exemple, par **microscopie confocale à balayage laser**, associée à des techniques de mesure par des micro-électrodes, on observe des conglomerats cellulaires emprisonnés dans une importante matrice extracellulaire à forte teneur en eau, avec des

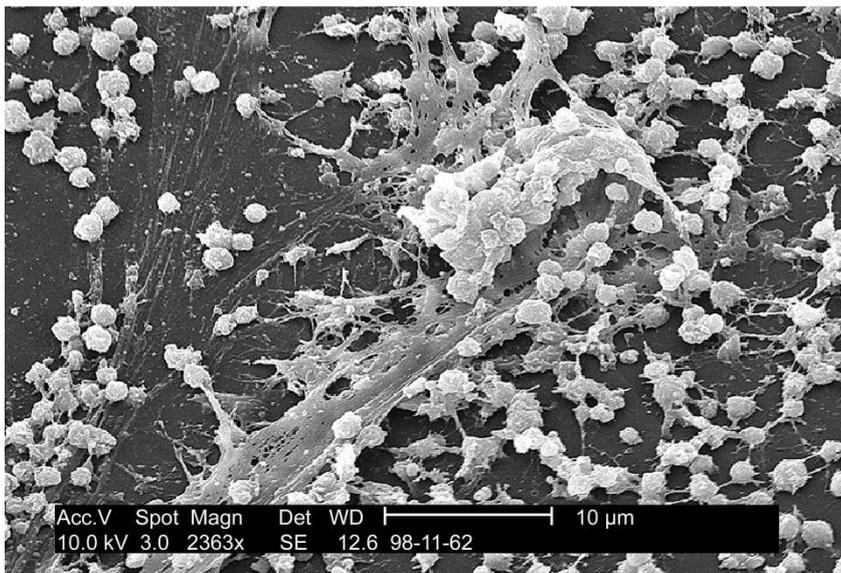
formes diverses : piliers cylindriques ou filaments évoquant une structure en forme de tulipe, de coraux ou de champignons (Photographie 1). Cette irrégularité structurale s'explique par la présence d'une multitude de pores et de canaux. Cette organisation tridimensionnelle particulière permet une protection optimale des individus formant le biofilm (Clutterbuck, 2007).

**Photographie 1: Biofilm de *Staphylococcus* spp. à la surface d'un implant médical.**

**Image obtenue par microscopie confocale.**

Photographie de Janice Car, Public Health Image Library Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA. Avec accord.

Sur la photographie, on observe des structures sphériques, ressemblant à des champignons, unis par des filaments. Cette organisation tridimensionnelle est caractéristique des biofilms.



La structure des biofilms est relativement hétérogène mais des propriétés architecturales communes existent. Il s'agit de conglomérats cellulaires agrégés dans une matrice d'exopolysaccharides. Les biofilms sont traversés d'une multitude de pores et de canaux permettant des échanges d'information, des flux d'eau, mais aussi des transports de nutriments et de déchets. On peut parler d'**écologie** du biofilm.

### **3. FORMATION ET ECOLOGIE DES BIOFILMS**

La formation d'un biofilm représente un changement radical de mode de vie des micro-organismes qui le constituent. Le passage d'un mode de vie planctonique, individuel, à un mode de vie communautaire et sessile, est un processus dynamique et complexe. Il est caractérisé par une modification de l'expression génétique et par un **changement de phénotypes** des micro-organismes concernés : les mêmes individus ne possèdent plus les mêmes propriétés ni les mêmes fonctions. L'environnement particulier du biofilm permet aux cellules de **coopérer** et d'interagir de manière différente que sous forme planctonique. Ainsi, les bactéries vivant en biofilm ont des propriétés sensiblement différentes de celles des bactéries planctoniques de la même espèce. L'activation de nombreux groupes de gènes ( $10^3$ ) en quelques minutes régule cette permutation de mode de vie (Costerton, 1999). Les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie commencent tout juste à être identifiés et compris (Goller, 2008). Les micro-organismes d'un biofilm disposent de mécanismes originaux pour s'attacher de façon réversible à une surface, y adhérer et former une communauté. Un véritable **écosystème**<sup>7</sup> va se former, puis se détacher sous l'influence de divers facteurs environnementaux (Donlan, 2002).

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

- Les cellules constituant le biofilm sont reliées entre elles par une **matrice extracellulaire** composée de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques,
- Le **développement d'un biofilm** est sous l'influence de **signaux extracellulaires** (environnementaux) et **cellulaires** (notion de quorum sensing : cf page 35),
- Le biofilm protège les bactéries qui le constituent de l'action des agents antimicrobiens, des défenses immunitaires de l'hôte et d'éventuels prédateurs.

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

---

<sup>7</sup> Un écosystème est un ensemble dynamique d'organismes vivants (plantes, animaux et micro-organismes) qui interagissent entre eux et avec le milieu dans lequel ils vivent (sol, climat, eau, lumière) avec une organisation tri-dimensionnelle particulière

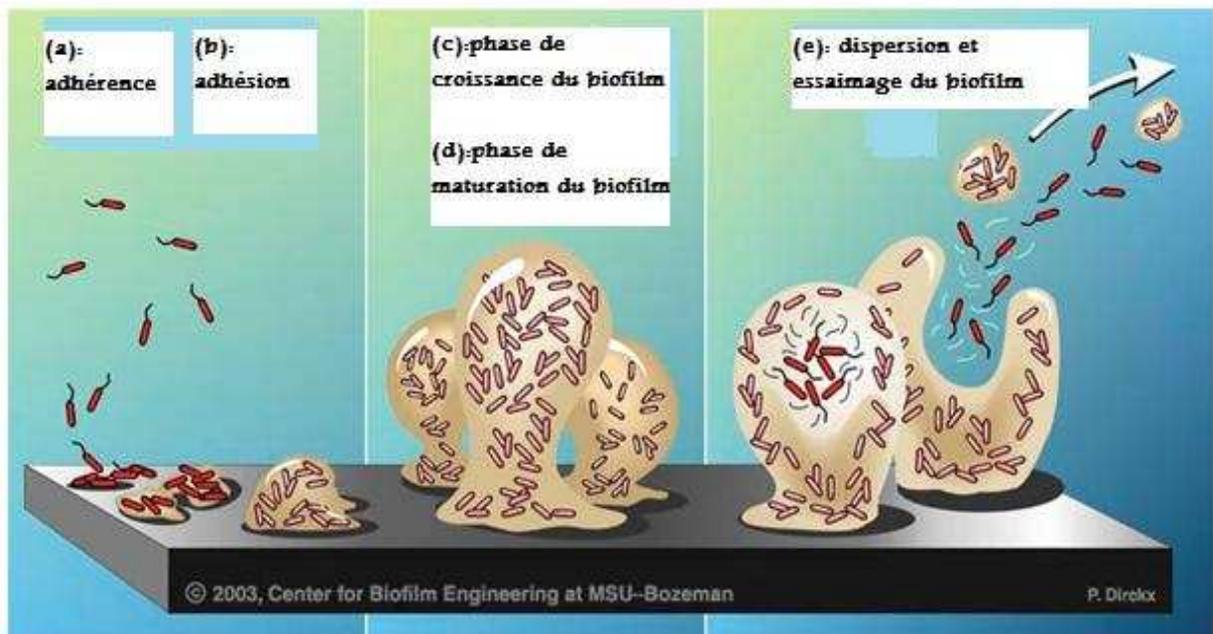
### **3.1. Les étapes de formation d'un biofilm**

On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms (Figure 2). Tout d'abord, les bactéries interagissent avec un substrat et s'y fixent de façon **réversible** par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on parle d'**adhérence** (Figure 2 (a)) (Golovlev, 2002 ; Van Houdt, 2005). Puis les bactéries se fixent de façon **irréversible** et **spécifique** au substrat grâce à des **molécules d'adhésion** comme par exemple les pili, et synthétisent une **matrice** d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'**adhésion** (Figure 2 (b)). On distingue ensuite des phases de croissance (Figure 2 (c)) et de maturation du biofilm (Figure 2 (d)). Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm (Figure 2 (e)), et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle d'**essaimage** du biofilm (Clutterbuck, 2007).

## Figure 2: Cycle de développement simplifié d'un biofilm.

D'après [<http://www.biofilm.montana.edu>], avec accord du Montana State University Center for Biofilm Engineering.

Les batonnets rouges représentent les bactéries à l'état planctonique et celles figurées en beige à l'état de biofilm. Ce dernier est représenté en beige. Les cinq stades successifs du passage d'un de ces états à l'autre sont schématisés : (a), (b), (c), (d) et (e) (cf commentaires dans le texte).



### **3.1.1. Attachement primaire réversible et non spécifique à une surface (adhérence)**

L'**interface solide-liquide** entre une surface et un milieu aqueux (eau, sang par exemple), fournit un environnement idéal pour la fixation de micro-organismes et la formation d'un biofilm. Dans un environnement liquide, les bactéries sont soumises à des **forces hydrodynamiques** lorsqu'elles s'approchent d'une surface. Les bactéries ont développé des mécanismes de motilité active afin de **contrer les forces répulsives et électrostatiques** rencontrées au voisinage des surfaces sur lesquelles elles se fixent. Par exemple, les bactéries Gram-négatives, comme *Escherichia coli* ou *Salmonella*, possèdent des **flagelles**. Ces derniers leur permettent d'entrer en contact avec une surface puis de s'y fixer

(Goller, 2008). Cependant, la motilité flagellaire n'est pas essentielle pour l'attachement initial et la formation d'un biofilm. L'absence de flagelle est compensée par l'existence d'autres molécules adhésives, comme les curli, permettant l'attachement de la bactérie à la surface (Beloin, 2008). Certaines bactéries sont capables d'établir un contact avec une surface par des mécanismes de signalisation et d'exprimer par la suite des adhésines à leur surface (Wang, 2004). Ce mécanisme est appelé « surface sensing ». Il existe chez *Escherichia coli*, (système de signalisation Cpx) mais les modes de fonctionnement ne sont pas encore connus (Goller, 2008). Les gènes codant pour les caractères de motilité (synthèse du flagelle, motilité, chimiotactisme...) sont inhibés une fois que les bactéries se sont fixées à la surface (Prigent-Combaret, 1999).

L'attachement primaire à une surface est sous l'influence de nombreux facteurs : pH, osmolarité du milieu, température.... (Beloin, 2008). Il est suivi par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface.

### **3.1.2. Attachement secondaire irréversible et spécifique à une surface (adhésion)**

#### **Mécanismes d'adhésion.**

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

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

## Molécules impliquées.

Les **fimbriae de type I**, ou **pili**, sont rencontrées chez la plupart des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Citrobacter* et *Enterobacter* par exemple). Elles interviennent dans la colonisation de tissus vivants et dans la formation de biofilms. La protéine adhésive FimH exprimée par les fimbriae de type I peut se lier à des glycoprotéines, comme par exemple les uroplakines des cellules uroépithéliales vésicales, les IgA ou encore les mucines pulmonaires et intestinales. La production de fimbriae de type I est un processus complexe gouverné par les **statuts nutritionnels** des cellules et les **conditions environnementales** (Goller, 2008). Les bactéries exprimant ce type d'organelles en expriment en moyenne 100 à 500 à leur surface (Beloin, 2008).

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

Les **pili de conjugaison** interviennent lors du contact initial avec la surface et lors de la phase de maturation du biofilm. Ils joueraient un rôle de stabilisation dans la structure du biofilm (Beloin, 2008). L'utilisation des pili de conjugaison met un terme à une mobilité désorganisée des bactéries et permet des interactions stables. Dès lors, l'attachement devient irréversible (O'Toole, 1998).

Certaines bactéries expriment à leur surface des **molécules spécifiques** intervenant lors de leur fixation à un substrat, différentes des molécules d'adhésion fréquemment rencontrées et citées précédemment. Prenons l'exemple des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infections du tractus urinaires suite à la colonisation de sondes urinaires. Soixante pour-cent des souches uropathogènes d'*Escherichia coli*<sup>8</sup> expriment à leur surface une **adhésine** appelée **Ag43**. Il s'agit d'un facteur protéique intervenant dans les phénomènes

---

<sup>8</sup> appellées aussi UPEC, pour UroPathogenic *Escherichia coli*

d'auto-aggrégation cellulaire. Cet épitope confère aux bactéries qui en sont porteuses la capacité de « s'auto-aggréger ». Ag43 intervient dans les contacts cellule-substrat et cellule-cellule et est exprimée de façon importante durant le mode de vie sous forme de biofilms (Schembri, 2003).

### **3.1.3. Phases précoces de développement du biofilm. Maturation du biofilm.**

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation. La maturation du biofilm est divisée en deux phases (Clutterbuck, 2007). La première phase est marquée par des **régulations de gènes** importantes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elles concernent essentiellement des gènes codant pour des **protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies** ; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support (Sauer, 2002). La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des **synthèses protéiques** importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm. L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (Clutterbuck, 2007). Soixante-dix gènes subiraient des modifications au cours de la maturation d'un biofilm (Whiteley, 2001).

### **3.1.4. Essaimage et dispersion du biofilm**

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du **stade de dispersion** : des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm. Des remaniements génétiques sont à l'origine du détachement des formes planctoniques. Ce dernier permet non seulement de **promouvoir une diversité génétique** mais aussi de **favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques** et par conséquent la formation d'autres biofilms (Clutterbuck, 2007).

La libération des formes planctoniques à partir du biofilm peut se faire selon **deux modalités** (Characklis, 1990 a). Les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités : on parle d'« **érosion** » du biofilm. Mais on peut assister à un détachement massif et rapide, « en lambeaux », de quantités importantes de bactéries, appelé

« sloughing<sup>9</sup> ». Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent **conserver des caractéristiques** du biofilm, comme l'**antibiorésistance**. En effet, les bactéries planctoniques essaimant d'un biofilm sont capables de résister aux défenses immunes de l'hôte et être à l'origine d'une infection (Donlan, 2002). Par exemple, les bactéries planctoniques qui essaient à partir de prothèses et d'implants médicaux sont capables de survivre à la phagocytose réalisée par les polynucléaires neutrophiles et d'engendrer une infection systémique (Clutterbuck, 2007).

### **3.2. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm**

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (Donlan, 2002).

#### **3.2.1. Caractéristiques de la surface**

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques<sup>10</sup> sur une surface jouent une influence sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm.

#### **Rugosité de la surface.**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (Characklis, 1990 b). Les **surfaces rugueuses** sont colonisées de façon préférentielle car les **forces répulsives sont moindres** et la **surface de fixation est augmentée**, grâce à la présence d'**aspérités** (Donlan, 2002). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (Donlan & Costerton, 2002). Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques.

---

<sup>9</sup> « sloughing » signifie « mue » en français.

<sup>10</sup> Dans les sources bibliographiques anglo-saxonnes, on parle de « conditioning films » pour désigner ces films protéiques favorisant la formation de biofilms.

### Propriétés physico-chimiques de la surface.

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se **fixent plus facilement** à des **surfaces hydrophobes et non polarisées** comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outrepasser les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaisons hydrophobes (Bendinger, 1993).

### Présence de films protéiques sur la surface.

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide intersitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (Mittelman, 1996).

La nature de ces films protéiques est différente selon les milieux. Prenons l'exemple des bactéries formant le biofilm de la plaque dentaire. Elles se fixent sur un film protéique, présent à la surface de l'émail dentaire et composé d'albumine, de lysosymes, de glycoprotéines, de phosphoprotéines et de lipides (Donlan, 2002). La présence de films protéiques sur des implants médicaux en contact direct avec un fluide favorisent la formation de biofilms. Par exemple, les cathéters veineux centraux, en contact direct avec le sang, sont recouverts de plaquettes, de plasma et de protéines: albumine, fibrinogène, fibronectine, laminine... (Goller, 2008).

**L'attachement à une matrice protéique** est la première étape de formation d'un biofilm dans le corps humain (Otto, 2008). Par exemple, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* expriment à leur surface des molécules, les MSCRAMM<sup>11</sup>, capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine (Patti, 1994). Ces interactions spécifiques entre matrice protéique de l'hôte et MSCRAMM sont très importantes pour l'établissement de la colonisation bactérienne.

---

<sup>11</sup> MSCRAMM signifie « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule »

### 3.2.2. Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs. On peut citer les facteurs suivants (Goller, 2008 ; O'Toole, 2000 ; Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Fletcher, 1988):

- **température**,
- **pH** : conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité (Martinez, 2007),
- concentration en oxygène,
- concentration en fer,
- **osmolarité**,
- présence d'ions spécifiques,
- **sources de carbone** disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007),
- concentrations en **nutriments** : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008),
- concentrations en certains **cations** : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na<sup>+</sup>, Calcium Ca<sup>2+</sup>, ion ferrique Fe<sup>3+</sup>, ion lanthanum) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988),
- **hydrodynamique du fluide** : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002),
- saison : il existerait un **effet saisonnier** sur la formation de biofilms (Donlan, 1994).

La formation d'un biofilm dépend, selon les bactéries, de conditions environnementales différentes. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* peut former des biofilms dans n'importe quelles conditions alors que d'autres bactéries nécessitent des conditions particulières de température, de pH ou encore de nutrition. Certaines bactéries peuvent s'adapter à des milieux par des modifications génétiques (Clutterbuck, 2007). Des **conditions environnementales stressantes** (fortes concentrations de sels, de sucres, d'alcools, hautes températures, variations extrêmes du pH) **inhibent la biosynthèse du flagelle** (Goller, 2008).

### 3.2.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. **Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes**. La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides... Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les **fimbriae**, certaines protéines, et les **acides mycoliques** (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des **surfaces hydrophobes**. Les **exopolysaccharides** et les **lipopolysaccharides** sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des **surfaces hydrophiles** (Donlan, 2002).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les **statuts nutritionnels** des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les **conditions environnementales** (pas de synthèse si pH bas, température basse ou forte osmolarité) (Goller, 2008). L'expression des **curli** est sous le contrôle de **cascades de phosphorylation**. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La **synthèse de curli est stimulée** dans les conditions environnementales suivantes : **faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate et fer ; microaérophilie et croissance ralentie** (Goller, 2008).

### 3.2.4. Conclusion : les facteurs influant sur la formation de biofilms

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

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

**Tableau 2: Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm**

D'après (Donlan, 2002)

| Propriétés du substrat                                       | Propriétés du milieu aqueux environnant   | Propriétés des cellules  |
|--|---|--|
| Texture, rugosité, présence d'aspérités                      | Vitesse du flux, présence d'un flux laminaire ou non  | Hydrophobicité de la surface des cellules                              |
| Hydrophobicité   | pH  | Présence de fimbriae   |
| Présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface | Température   | Présence de flagelles  |
|  | *Cations (Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> ...)<br>*[Fer], [nutriments]<br>*Sources de carbone disponibles<br>*Disponibilité du milieu en oxygène | Rôle des structures polymériques extracellulaires d'exopolysaccharides |
|  | Présence d'agents anti-microbiens   |  |

### **3.3. Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm**

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

- **l'action mécanique** exercée par un flux de liquide, par exemple au sein d'une vessie ;
- **l'arrêt de la synthèse** de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple,
- **la lyse de cellules du biofilm** par l'action d'un phage, d'EDTA, de NaCl, de CaCl<sub>2</sub>, ou encore d'agents chélateurs (Spormann, 2008),
- l'action de **facteurs de détachements** : surfactants ou enzymes dégradant la matrice (Otto, 2008).

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

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

Au sein d'un biofilms, les bactéries vivent en communauté, sont fixées à un support, et interagissent. On peut ainsi parler d' « écologie du biofilm ».

### **3.4. Ecologie d'un biofilm**

On distingue différents types d'interactions qui ont des effets positifs ou négatifs pour les membres de la communauté bactérienne. On peut citer comme exemple bénéfique la **coopération dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes**, ou encore la **production d'enzymes** profitables à l'ensemble de la communauté de micro-organismes (Tomlin, 2005). A l'opposé, les différentes colonies de micro-organismes occupant une même niche écologique **entrent en compétition** pour l'acquisition des ressources se trouvant dans le milieu. Deux mécanismes de compétition entre bactéries est la **production de bactériocines**<sup>12</sup> et la **baisse du pH** (Irie, 2008).

Les biofilms ont une architecture complexe et irrégulière, en forme de coraux ou de champignons. Cette architecture n'est pas figée: les micro-organismes bougent à partir du lieu de leurs premières divisions cellulaires : il y a une véritable **dynamique interne** au sein des biofilms (Clutterbuck, 2007). Les micro-colonies de bactéries sont imbriquées au sein d'une matrice d'exopolymères contenant des **canaux aqueux** et des **pores**, permettant des échanges d'eau, de nutriments, de déchets, mais aussi d'information et de caractères transmissibles génétiquement (caractères de résistance aux antibiotiques par exemple). L'échange de plasmides au sein des biofilms se fait par des phénomènes de conjugaison. Ainsi, l'organisation en biofilm permet de sélectionner et de répandre des caractères de résistance à des agents anti-microbiens (Donlan, 2002). Dans les régions inaccessibles à ces canaux, par exemple au sein des conglomerats de cellules, des **mécanismes de diffusion passive** assurent les échanges métaboliques (Stewart, 2003 ; Wanner, 2006). La **diffusion** des nutriments se fait de façon **inéga**le au sein du biofilm, suite à l'existence de gradients. Ceci explique que toutes les cellules n'ont pas la même activité métabolique et donc pas la même vitesse de croissance (Spormann, 2008).

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

---

<sup>12</sup> Les bactériocines sont des polypeptides de 20 à 60 acides aminés produits par certaines bactéries. Ils ont des propriétés bactéricides et bactériostatiques, et agissent au niveau de la membrane cellulaire des bactéries Gram positives.

## **4. REGULATION DE LA FORMATION DES BIOFILMS**

### **4.1. Le quorum sensing**

#### **4.1.1. Le quorum sensing. Définition et mécanismes**

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de **quorum sensing**. Il s'agit de **mécanismes de contrôle des processus** ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des **signaux de cellules à cellules**, et **dépendant de la quantité de cellules présentes** : on parle de mécanismes de perception du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (Costerton, 1999 ; Tomlin, 2005). Une fois que les signaux atteignent une **valeur seuil** (valeur critique), des **régulateurs transcriptionnels sont activés** et exercent un **contrôle sur des gènes** spécifiques (Costerton, 1999 ; Clutterbuck, 2007 ; Irie, 2008). La nature et la fonction des molécules signalant les échanges de cellule-à-cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (Costerton, 1999). Des **mutations** de gènes impliqués dans les mécanismes de quorum sensing entraînent des **répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms**. Ces gènes exercent un **contrôle** sur une grande partie de **l'expression du transcriptome<sup>13</sup> et du protéome<sup>14</sup>**, avec en particulier un contrôle de l'expression de facteurs de virulence comme les protéases par exemple (Tomlin, 2005).

Les molécules du quorum sensing sont variées, et diffèrent d'une espèce bactérienne à une autre.

#### **4.1.2. Les molécules du quorum sensing**

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries (Parsek, 2004 ; Irie, 2008). On trouve des **acylhomosérines lactones** (AHL) chez la plupart des bactéries **Gram-négatives**. La majorité des bactéries **Gram-positives** utilisent des **peptides auto-inducteurs**, dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du quorum sensing sont **dégradées par des enzymes** : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (Irie, 2008).

---

<sup>13</sup> Transcriptome : ensemble des ARNm au sein d'une population de cellules

<sup>14</sup> Protéome : ensemble des protéines traduites au sein d'une population de cellules

#### 4.1.3. Rôles du quorum sensing

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en **modulant la taille de la population** du biofilm, et en prenant en compte les conditions environnementales. Il **initie les phénomènes de dispersion** et d'essaimage de bactérie planctoniques à partir du biofilm (Irie, 2008). Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm (Clutterbuck, 2007). Il peut **réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères**, comme par exemple la motilité ou certains **facteurs de virulence extracellulaires**, comme les **protéases** (Clutterbuck, 2007), (Irie, 2008). Le quorum sensing jouerait un rôle dans **l'établissement d'antibiorésistances**, mais cette hypothèse reste controversée. Les molécules du quorum sensing jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires (exemple de *Serratia marcescens*) (Queck, 2006).

Les synergies observées au sein des biofilms constitués de différentes espèces de micro-organismes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le quorum sensing (Bjarnsholt, 2005). Les biofilms composés de plusieurs communautés de bactéries d'espèces différentes ont de **fortes concentrations en molécules du quorum sensing**, compte-tenu de la densité élevée de cellules présentes.

#### 4.1.4. Altération du quorum sensing. Conséquences

L'altération des mécanismes de quorum sensing peut aboutir à **d'importantes modifications phénotypiques** des micro-organismes du biofilm, par exemple une **sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques**, ou encore des **anomalies dans le cycle de développement du biofilm**, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (Irie, 2008). Les biofilms mutants pour les molécules du quorum sensing ont une **structure tridimensionnelle déficiente**. Par exemple, les mutants de *Burkholderia cenocepacia* pour les molécules du quorum sensing sont toujours capables de se fixer à une surface mais l'organisation spatiale des cellules est altérée de façon drastique ; de plus, on constate une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques de ces bactéries pendant la phase de croissance du biofilm (Tomlin, 2005). Des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* **mutantes pour les molécules du quorum sensing** sont **moins résistants** à l'action de la tobramycine, du peroxyde d'hydrogène et des macrophages (Burmolle, 2006).

#### **4.1.5. Interaction du quorum sensing avec d'autres molécules : exemple de la lactoferrine**

L'organisme possède un moyen d'empêcher la formation de biofilms. Le système immunitaire inné de l'hôte possède une protéine chélatant des ions, la **lactoferrine**, capable d'interférer avec les molécules du quorum sensing. Elle confère aux bactéries un type de motilité particulier, appelé « twitching <sup>15</sup> », qui les empêche de former des agglomérats de cellules et par conséquent de former un biofilm (Singh, 2002).

La formation d'un biofilm est contrôlée par des signaux de cellules à cellules, mais pas uniquement. Il existe une régulation génétique de la formation de biofilms par les cellules fixées, différentes des mécanismes du quorum sensing.

#### **4.2. Régulation génétique par les cellules fixées**

Après fixation sur un substrat, l'expression d'un certain nombre de gènes est régulée par les cellules fixées. Cette régulation peut être de type inhibiteur ou stimulateur. Elle va entraîner une modification phénotypique des bactéries et avoir pour conséquence la formation d'un biofilm (Donlan, 2002). Au cours de la formation d'un biofilm, **22% des gènes sont stimulés et l'expression de 16% des gènes est inhibée** (Prigent-Combaret, 1999). Lors de la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus*, des **gènes codant pour des enzymes intervenant dans la fermentation et la glycolyse** (phosphoglycérate mutase, triosephosphate isomérase et alcool déshydrogénase) sont **stimulés**. Ceci peut être relié au fait que la concentration d'oxygène dans le biofilm diminue au fur et à mesure de son développement (Becker, 2001).

#### **4.3. Régulation de la formation des biofilms par le GMP-c**

Le 3'-5'-guanosine-monophosphate cyclique, plus communément appelé GMP-c, est un **régulateur central du mode de vie sous forme de biofilms** et de **l'expression de facteurs de virulence**. Le GMP-c est un **second messenger**, intervenant dans des **cascades de phosphorylations** et **modulant l'expression de certains gènes** des bactéries du biofilm, impliqués dans les mécanismes de formation du biofilm et dans l'expression de la virulence. La transformation du GTP en GMP-c par la diguanylate cyclase est activée par des signaux

---

<sup>15</sup> De l'anglais « to twitch »: sauter, tressaillir

extracellulaires, différents selon les bactéries concernées. Lorsque la quantité de GMP-c augmente au sein de la cellule, la quantité de protéines jouant un rôle de facteurs de virulence augmente (Cotter, 2007). Beaucoup d'interrogations à propos de ce mécanisme restent encore en suspens.

#### **4.4. Régulation de la formation des biofilms par l'acétyl phosphate et l'alarmone : Régulation de l'expression de certains gènes en fonction des conditions nutritionnelles**

Récemment, de petites molécules intervenant dans la régulation de la formation d'un biofilm selon les conditions nutritionnelles du milieu ont été identifiées. Il s'agit de **l'acétyl phosphate** et de **l'alarmone**. L'acétyl phosphate s'accumule dans le milieu intracellulaire lorsque la concentration en source carbonée augmente et/ou lorsque la concentration en oxygène est basse (Wolfe, 2003). L'alarmone s'accumule lorsque les concentrations en nutriments sont très basses : elle induit une cascade enzymatique aboutissant à la régulation de l'expression de gènes, notamment de gènes codant pour des fimbriae de type I. L'action de cette molécule va permettre d'augmenter la probabilité de survie des bactéries dans des milieux stressants (Beloin, 2008).

#### **4.5. Autres mécanismes régulateurs de la formation de biofilms**

Les **polysaccharides présents à la surface des cellules** jouent un rôle important dans les interactions entre bactéries et leur environnement immédiat. Par exemple, on trouve à la surface d'*Escherichia coli* l'antigène du lipopolysaccharide O (LPS) et l'antigène polysaccharidique de capsule K. Les lipopolysaccharides, appelés aussi endotoxines, font partie de la paroi des bactéries Gram-négatives. Ils peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilms selon les cas. Les polysaccharides des capsules sont des facteurs de virulence ; ils protègent les bactéries des défenses immunitaires de l'hôte (phagocytose et activation du complément) (Beloin, 2008).

Trois polymères synthétisés par les bactéries du biofilm et faisant partie de la matrice ont un rôle important dans la formation d'un biofilm et dans l'expression de facteurs de virulence; il s'agit de la **cellulose**, de **l'acide colanique** (polymère chargé composé de glucose, galactose, fucose et acide glucuronique) et du **PGA** ( $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine).

La synthèse d'acide colanique peut être induite par des concentrations d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, proches des concentrations létales ; l'acide colanique forme une capsule. Il en résulte une exacerbation de la formation et de la persistance d'un biofilm face à des agents anti- microbiens (Sailer, 2003).

Le mode de vie sous forme de biofilms protège les micro-organismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques, synergies entre micro-organismes, expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress...

## **5. LES BIOFILMS DANS LEUR ENVIRONNEMENT**

### **5.1. Avantages conférés par le mode de vie en biofilm**

Les études menées sur les biofilms ces dernières années ont permis d'établir l'existence de changements radicaux dans l'expression génétique et les phénotypes entre les formes planctonique et sessile. Ces changements radicaux permettent d'expliquer **l'adaptation des biofilms à des conditions environnementales stressantes** et **l'acquisition d'avantages évolutifs** (Clutterbuck, 2007 ; Goller, 2008). Par exemple, les micro-organismes au sein des biofilms sont plus résistants à la réponse immunitaire de l'hôte et aux agents antibactériens que leurs congénères vivant sous forme planctonique (Clutterbuck, 2007). Néanmoins, on commence tout juste à comprendre et à identifier les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie (Goller, 2008).

On va s'intéresser dans la partie qui va suivre aux différents avantages conférés par le mode de vie sous forme de biofilms. On distingue tout d'abord des **avantages métaboliques**.

#### **5.1.1. Avantages métaboliques**

Le mode de vie en biofilm permet aux bactéries d'acquérir des avantages d'un point de vue métabolique. L'organisation communautaire du biofilm permet **d'optimiser les mécanismes de capture de substrats** et de réaliser de véritables **économies d'énergie**. Des réserves énergétiques sont ainsi constituées (Bury-Moné, 2007). D'autre part, l'organisation architecturale complexe du biofilm permet une **coopération** entre micro-organismes dans les **systèmes de dégradation de certains nutriments complexes** (Tomlin, 2005). Le mode de vie en biofilm assure une promiscuité entre cellules et permet la réalisation **d'actions synergiques**. Prenons l'exemple de la nitrification, phénomène important intervenant dans l'épuration des eaux. *Nitrosomonas* transforme l'ammonium présent dans les eaux souillées en nitrites ; ces nitrites sont alors transformés en nitrates par *Nitrospira*. La structure en biofilm avec *Nitrosomonas* permet à *Nitrospira* de disposer directement de son substrat afin de réaliser la réaction de nitrification (Wanner, 2006).

Le mode de vie sous forme de biofilm apporte ainsi des avantages d'un point de vue métabolique aux micro-organismes le constituant : économie d'énergie et constitution de réserves. Il préserve aussi ces derniers de l'action d'un certain nombre de facteurs hostiles présents dans l'environnement.

### **5.1.2. Protection des micro-organismes du biofilm**

L'organisation structurale en biofilm procure aux micro-organismes le constituant une véritable gangue protectrice et les préserve d'un certain nombre de facteurs d'agression comme par exemple la dessiccation ou encore l'action d'agents antibiotiques.

#### **Protection mécanique : importance de la matrice.**

La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle de **protection mécanique passive** très important. Tout d'abord, elle protège les micro-organismes du biofilm de la **dessiccation** (Clutterbuck, 2007). Dans certaines conditions, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001). D'autre part, la matrice protège les micro-organismes de la dérive en les empêchant d'être emportés par le courant. Elle permet ainsi la colonisation de niches écologiques (Wanner, 2006).

La matrice assure aussi une **protection mécanique** des micro-organismes contre l'entrée dans le biofilm **d'antiseptiques**, de **détergents** et **d'antibiotiques** (cf page 70) (Costerton, 1999).

La matrice crée un environnement protégé et assure la protection génétique des micro-organismes du biofilm et l'acquisition de caractères de résistance. L'organisation en communauté de micro-organismes au sein du biofilm est propice à l'échange d'informations, avec entre autres, la possibilité de transfert de caractères de résistance (Costerton, 1999).

#### **Protection contre la destruction des cellules.**

Des **mutations génétiques** au niveau de séquences codant pour les molécules du quorum sensing dans certains micro-organismes entraînent des changements de phénotypes et l'acquisition de caractères de résistance à la destruction physico-chimique des cellules (Tomlin, 2005). D'autre part, les biofilms résistent mieux aux stress thermiques et à l'exposition aux rayons ultra-violetts que les micro-organismes vivant sous forme planctonique (Martinez, 2007).

Le mode de vie des micro-organismes sous forme de biofilm confère donc non seulement des avantages d'un point de vue métabolique, une protection mécanique, l'acquisition de caractères de résistance aux antibiotiques mais permet aussi l'acquisition d'une meilleure résistance aux rayons ultraviolets et aux hautes températures par rapport à leurs congénères planctoniques.

## **5.2. Biofilms et adaptations aux conditions environnementales**

### **5.2.1. Biofilms et stress environnemental : activation du facteur $\sigma$ RpoS**

Des études menées sur des biofilms d'*Escherichia coli*, de *Vibrio cholerae* et de *Pseudomonas aeruginosa* ont permis de montrer l'importance du rôle d'un facteur, le **facteur  $\sigma$  RpoS**, dans la réponse des communautés microbiennes organisées en biofilms dans des situations de stress (Spormann, 2008).

**Certaines conditions environnementales** engendrant un **stress** pour les cellules (stress oxydatif, irradiation UV, hautes températures, hyper-osmolarité, baisse importante du pH, manque de source carbonée...) entraînent des **modifications de l'expression du génome**. Lors d'un stress, il y a **activation du facteur  $\sigma$  RpoS**, qui va stimuler la **réponse au stress** par un ensemble de **modifications du métabolisme des cellules** (Spormann, 2008). **L'intégration de l'ensemble des stress** auxquels sont soumises les cellules **par le facteur RpoS** va ainsi engendrer des **modifications phénotypiques importantes du biofilm**, dont l'acquisition d'une antibiorésistance. On peut lister l'ensemble des modifications métaboliques au sein d'un biofilm en situation de stress de la façon suivante (Spormann, 2008) :

- **Entrée en métabolisme ralenti,**
- **Diminution de la croissance,**
- Expression de **facteurs de virulence,**
- Augmentation de la résistance des biofilms aux antibiotiques et autres agents anti-microbiens,
- Stimulation de la **synthèse d'exopolysaccharides et de curli,**
- Stimulation de la **synthèse de transporteurs,**
- **Inhibition de la biosynthèse du flagelle** : lors de fortes concentrations de sels, de sucres, d'alcools, hautes températures, variations extrêmes du pH (Goller, 2008),
- **Dispersion du biofilm**, détachement et essaimage de bactéries planctoniques, influencés par la **disponibilité** du milieu **en nutriments**, la **concentration en oxygène**, le **pH**, la présence de **certaines composés spécifiques** (Gjermansen, 2005), (Goller, 2008).

L'exemple du rôle de RpoS au sein des biofilms de *Vibrio cholerae* est très intéressant. Il joue un rôle clef dans la dernière phase de l'infection au niveau de l'intestin et dans la dispersion du biofilm de *Vibrio cholerae*. RpoS intervient dans l'essaimage des cellules à partir de biofilms formés sur des muqueuses. Une des cibles de l'action de RpoS est la biosynthèse des vibriopolysaccharides VPS (Muller, 2007 ; Nielsen, 2006). Ainsi, le **facteur RpoS** occupe un rôle central dans la **régulation de la physiologie des micro-organismes**.

### 5.2.2. Résistance aux stress environnementaux : biofilms homogènes et biofilms hétérogènes

On rappelle que les biofilms sont composés d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes, qualifiés respectivement de **biofilms homogènes et hétérogènes**. Ces deux catégories de biofilms répondent-elles de la même façon à une situation de stress ? **L'organisation multispécifique d'un biofilm permet-elle d'augmenter le fitness<sup>16</sup> du biofilm ?** Des expériences ont été réalisées avec des biofilms composés respectivement d'une et de quatre espèces différentes de micro-organismes, afin d'évaluer la résistance aux agents anti-microbiens (Burmolle, 2006). Les agents anti-microbiens testés dans cette étude sont le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) et la tétracycline. Le peroxyde d'hydrogène est à l'origine d'un stress oxydatif de la bactérie. La tétracycline inhibe la synthèse de protéines bactériennes. Les bactéries suivantes ont été mises en présence des agents anti-microbiens cités, en biofilm homogène et en biofilm hétérogène : *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* et *Acinetobacter lwoffii*. L'activité des biofilms permettant d'évaluer la résistance aux agents antimicrobiens a été déterminée par le test de réduction du 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). Le TTC est un composé soluble et incolore qui, lorsqu'il est réduit par le complexe enzymatique oxydatif bactérien devient un sel rouge insoluble. Les résultats de l'étude démontrent que **le peroxyde d'hydrogène et la tétracycline sont moins efficaces sur les biofilms composés d'espèces différentes de micro-organismes**. Ainsi, les biofilms hétérogènes sont significativement **plus résistants aux antibiotiques** que les biofilms homogènes (Burmolle, 2006).

---

<sup>16</sup> Le **fitness** est la **capacité** d'un organisme ou d'un biofilm à **survivre** ou à **croître** dans un **environnement donné** ou sous l'influence d'un **stress** environnemental (Burmolle, 2006).

La **résistance accrue des biofilms hétérogènes** aux agents antimicrobiens peut être liée à des modifications de la matrice extracellulaire des biofilms, qui serait alors moins perméable. Il y aurait des interactions entre les polymères sécrétés par les divers micro-organismes du biofilm, qui aboutiraient à une **augmentation de viscosité de la matrice** (Skillman, 1999 ; Burmolle, 2006).

Les biofilms hétérogènes sont **plus résistants à l'invasion d'autres micro-organismes**. Prenons l'exemple de l'invasion de biofilms par *Pseudoalteromonas tunicata*. Il s'agit d'une bactérie marine qui a pour particularité de produire des substances bactéricides de haut poids moléculaire. Une de ces protéines est bactéricide pour les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Les biofilms homogènes et hétérogènes ont été exposés à ces protéines, visualisables par un immunomarqueur fluorescent. Les résultats montrent que l'invasion des biofilms par *Pseudoalteromonas tunicata* est moindre dans les biofilms hétérogènes, comparativement aux biofilms homogènes (Burmolle, 2006).

Les espèces bactériennes ont tout à gagner en s'organisant en biofilms avec d'autres espèces bactériennes car cela leur permet d'**acquérir des avantages** et un **fitness augmenté** et d'être **plus résistantes aux stress environnementaux que les biofilms homogènes**. Cette capacité de résistance exprimée par les biofilms rend leur élimination difficile. Ceci a un impact considérable, compte-tenu de l'importance médicale et industrielle des biofilms.

## **6. IMPORTANCE DES BIOFILMS**

### **6.1. Flore commensale et protection de l'organisme**

Tous les organes internes creux en communication directe avec l'environnement extérieur comme la bouche, l'anus, les cavités nasales ou encore le vagin, sont des niches écologiques abritant des micro-organismes qui existent majoritairement sous forme de biofilms. Ces micro-organismes sont pour la plupart des bactéries, mais on trouve aussi des champignons et des levures (Martini, 2006). Ils co-évoluent avec leur hôte et son système immunitaire et jouent un **rôle fonctionnel important** pour l'organisme, dans la digestion par exemple, surtout chez les ruminants. Ces micro-organismes, présents de façon physiologique chez un individu sain, constituent la **flore commensale de l'organisme**.

Cette flore commensale se trouve à la surface de la **peau** et des **muqueuses** (appareils digestif, respiratoire, urinaire et génital) d'un individu sain (Martini, 2006). Elle joue un véritable **rôle de protection de l'organisme** face à des infections. Elle n'est, à l'état normal chez un individu sain, à l'origine d'aucune infection. Ceci est dû la présence d'une véritable **homéostasie bactérienne**. Tout **désordre de cette homéostasie** entraîne des **troubles** (digestifs, cutanés...). On rencontre ainsi des infections dues à des micro-organismes de la flore commensale lors d'effraction des barrières cutanées et muqueuses. Les micro-organismes de la flore commensale ne peuvent donc devenir pathogènes que lorsque des conditions de déséquilibre leur permettent de proliférer.

#### **6.1.1. Flore commensale cutanée**

La flore commensale cutanée sera présentée de façon plus détaillée dans la partie consacrée à la peau (cf page 101). Brièvement, les bactéries les plus rencontrées à la surface de la peau chez l'Homme sont des bactéries Gram-positives des genres *Staphylococcus* et *Streptococcus*. La plupart de ces bactéries sont des bactéries opportunistes, comme *Staphylococcus epidermidis*. Cette bactérie est à l'origine d'infections cutanées chez les individus immunodéprimés (individus HIV-positifs, toxicomanes, traitement immunosuppresseur, nouveau-né...), alors que chez les **patients sains** non immunodéprimés, elle n'est à l'origine d'une **infection** uniquement en cas de **pénétration de la barrière cutanée ou des muqueuses** : traumatisme, inoculation, implantation de matériel médical et formation d'un biofilm (Otto, 2008)...

### 6.1.2. Flore commensale du tractus digestif

On trouve à tous les étages du tractus digestif des **micro-organismes sous forme planctonique** dans la **lumière** du tube digestif, mais aussi des micro-organismes fixés à la muqueuse et **organisés en biofilms**. L'**œsophage** et l'**estomac** sont les régions du tube digestif les moins riches en termes de population bactérienne (MacFarlane, 2007).

La **flore oesophagienne** est majoritairement anaérobie. Elle provient des bactéries de la flore buccale, qui sont essentiellement des streptocoques et des lactobacilles. Les patients atteints du **syndrome de Barrett** ont une **population bactérienne plus diversifiée** qu'un individu sain. Le syndrome de Barrett se caractérise par une métaplasie de la partie distale de l'œsophage, donnant lieu à des ulcères oesophagiens et favorisant l'apparition d'adénocarcinome oesophagien. La plupart des espèces bactériennes en présence lors du syndrome de Barrett sont réductrices du nitrate, et peuvent causer des **dommages tissulaires** (MacFarlane, 2007). L'observation de biofilms oesophagiens chez un individu sain et chez un individu atteint du syndrome de Barrett montre une organisation différente des bactéries (Photographie 2). Chez l'individu sain, on trouve des micro-colonies éparses et de petite taille. Chez un individu malade, on observe de volumineux agrégats de bactéries et une croissance bactérienne massive.

**Photographie 2: Biofilms oesophagiens chez un individu sain et un individu atteint du syndrome de Barrett.**

D'après (MacFarlane, 2007), avec accord.

Sur les photographies (a) et (b), obtenues par microscopie confocale à balayage laser, les bactéries colorées en jaune sont vivantes et celles colorées en rouge sont mortes. La photographie (a) montre la flore de la muqueuse oesophagienne d'un individu sain. Les bactéries sont dispersées sous forme de micro-colonies éparses et de petite taille. La photographie (b) montre la flore de la muqueuse oesophagienne d'un individu atteint du syndrome de Barrett. On observe de volumineux agrégats de bactéries vivantes (en jaune), témoins d'une croissance bactérienne massive.



Micro-colonies éparses  
et de petite taille  
(individu sain)



Volumineux agrégat  
bactérien (individu malade)

A l'exception des périodes proches des repas, l'estomac contient **peu de bactéries** chez un individu sain. Il s'agit de **bactéries provenant de la cavité buccale** (streptocoques, lactobacilles). L'acidité gastrique empêche de trop importantes proliférations bactériennes. Certains patients peuvent porter, de façon asymptomatique ou non, *Helicobacter pylori*, bactéries en général responsables d'ulcères duodénaux. Les **sondes de gastrotomie** fixées chirurgicalement afin de réaliser une alimentation parentérale peuvent être recouvertes de **biofilms** lorsqu'elles sont placées dans le tube digestif. La plupart des bactéries rencontrées sont anaérobies facultatives. Elles sont **potentiellement pathogènes**. On trouve, entre autres, des bifidobactéries, des staphylocoques, des streptocoques, des lactobacilles, des klebsielles et des coliformes (MacFarlane, 2007).

La flore bactérienne de l'intestin grêle est **légèrement plus importante** que dans l'estomac. Les **populations bactériennes** deviennent **de plus en plus nombreuses** au fur et à mesure de la **progression dans le tube digestif**. Au niveau de la valvule iléo-caecale, on trouve des populations de germes fécaux très importantes:  $10^8$ - $10^9$  germes par gramme de contenu intestinal (MacFarlane, 2007).

Le **gros intestin** est la partie la **plus abondamment colonisée**. Les biofilms rencontrés sont majoritairement composés de plusieurs espèces bactériennes. Leur développement est conditionné par les conditions environnementales et nutritionnelles. Les biofilms formés sur la muqueuse colique jouent un **rôle dans les maladies inflammatoires de l'intestin** (MacFarlane, 2007).

Les bactéries sont présentes à l'état normal dans le tube digestif d'un individu sain. Toute rupture dans l'homéostasie des populations bactériennes donne lieu à des désordres digestifs, comme par exemple la colite ulcéraire. Les biofilms peuvent être à l'origine d'infections chroniques. Ils ont donc une importance médicale considérable.

## **6.2. Importance médicale des biofilms**

### **6.2.1. Biofilms et infections chroniques**

Les biofilms sont responsables d'un **large éventail d'infections** chez l'Homme. En effet, 65% des infections recensées dans les pays développés sont dûes à des biofilms. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall-Stoodley, 2004).

#### **6.2.1.1. Biofilms et santé publique**

Les biofilms sont à l'origine d'**infections chroniques** et d'infections contractées en milieu hospitalier, le plus souvent en rapport avec le port de prothèses médicales, on parle donc d'**infections nosocomiales**. Les infections à biofilms **sont résistantes aux traitements antibiotiques**, et posent de sérieux problèmes en matière de santé publique. Certaines maladies peuvent même favoriser la formation de biofilms, comme nous le verrons avec l'exemple de la mucoviscidose.

#### **6.2.1.2. Infections liées à la présence de biofilms**

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

- ✓ **Infections ou maladies :**
- Caries dentaires,
- Gingivites,
- Péritonite,
- Mucoviscidose,
- Otite moyenne (notamment chez l'enfant),
- Ostéomyélites,
- Prostatites.

✓ **Infections nosocomiales :**

- Sutures,
- Lentilles de contact,
- Port d'un implant médical :
  - Sonde urinaire,
  - Cathéter veineux central,
  - Sonde endotrachéale,
  - Sonde de gastrotomie,
  - Valve cardiaque artificielle,
  - Prothèse orthopédique,
  - Broches (ostéomyélite).

**6.2.1.3. Epidémiologie. Facteurs favorisant le développement d'infections dues à des biofilms**

Les catégories d'individus présentant le plus de risques de développer des infections dues à la présence de biofilms sont les **individus immunodéprimés** ou **porteurs de prothèses médicales**. Les agents bactériens les plus fréquemment rencontrés font partie de la flore commensale de l'organisme et sont organisés en biofilms (Costerton, 1999). **Certaines maladies favorisent l'invasion des bactéries et la formation de biofilms**. C'est le cas, entre autres, de la **mucoviscidose**, qui est une affection héréditaire de l'appareil respiratoire profond caractérisée par la présence dans les poumons d'un mucus très visqueux (Clutterbuck, 2007). L'attachement à des surfaces recouvertes de mucus visqueux est plus rapide et plus massif et donne lieu à des agrégats bactériens plus importants que sur du verre ou sur des filaments d'actine. Un déséquilibre de charges ioniques favorise l'attachement de bactéries à une surface naïve. La plupart des composants extracellulaires des bactéries sont des molécules chargées négativement. Un excès de charges positives au niveau d'une surface va donc favoriser, par l'attraction exercée, l'attachement des bactéries au niveau de cette surface. Dans la mucoviscidose, un **excès d'ions calcium Ca<sup>2+</sup>** dans le surfactant permet à ***Pseudomonas aeruginosa* de se fixer** et d'être à l'origine d'une infection (Clutterbuck, 2007).

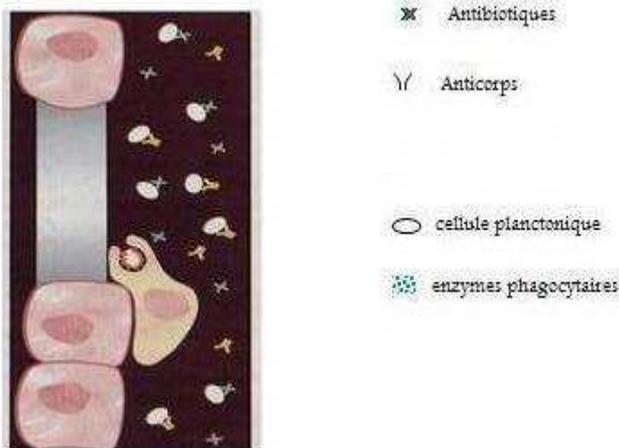
#### 6.2.1.4. Biofilms et infections chroniques : Mécanismes

Des bactéries **sous forme planctonique** sont capables de coloniser les cellules d'un organisme- hôte. Ces bactéries vont stimuler la réponse immune de l'hôte et vont pouvoir être **éliminées par ses mécanismes de défense naturels** (anticorps, phagocytes...). Elles sont sensibles aux antibiotiques (Figure 3).

#### **Figure 3 : Infection de l'hôte par des bactéries planctoniques et stimulation de la réponse immunitaire**

D'après (Costerton, 1999)

Des bactéries planctoniques, représentées par des ovales blancs, pénètrent dans l'organisme de l'hôte. Elles vont stimuler la réponse immune de l'hôte : des phagocytes et des anticorps (représentés par des symboles en « Y ») affluent au niveau du site de l'infection. Les bactéries planctoniques sont éliminées par les effecteurs de la réponse immune et l'infection est maîtrisée. Les antibiotiques (représentés par des croix) éliminent aussi de façon efficace les bactéries sous forme planctoniques (ovales blancs).



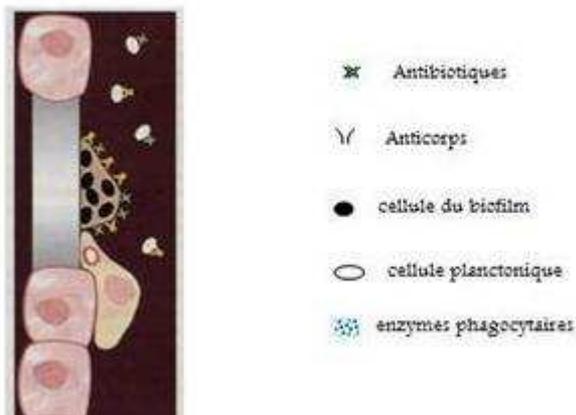
Le mécanisme présenté ci-dessus est valable uniquement pour les bactéries sous forme planctonique. Or, dans les conditions naturelles, la majorité des micro-organismes existent sous forme de biofilms. Les défenses immunes de l'hôte ne sont pas assez efficaces pour éliminer les biofilms présents dans l'organisme, qui sont donc à l'origine d'infections chroniques. Lors de l'infection d'un organisme par des biofilms, les bactéries pénètrent dans l'organisme sous forme planctonique. Par leur introduction dans l'organisme, elles stimulent la réponse immune de l'hôte. Puis, elles adhèrent à une surface et forment un biofilm au sein

de l'organisme. Suite à la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte, on assiste à un afflux massif d'anticorps spécifiques des antigènes du biofilm et de phagocytes sur le lieu de formation du biofilm (Figure 4).

**Figure 4: Mécanismes des infections chroniques causées par des biofilms : Formation d'un biofilm et stimulation de la réponse immunitaire**

D'après (Costerton, 1999)

Les bactéries sous forme planctonique sont représentées par des ovales blancs. Les bactéries organisées en biofilm sont représentées par des ovales noirs, regroupés en amas et englobés dans une matrice, figurée en beige. Des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes du biofilm (représentés par des symboles en « Y ») affluent massivement au niveau du site de formation du biofilm. Ils reconnaissent de façon spécifique les bactéries contre lesquelles ils sont dirigés, mais uniquement celles sous forme planctonique (ovales blancs), car la matrice protège les bactéries du biofilm de leur action.



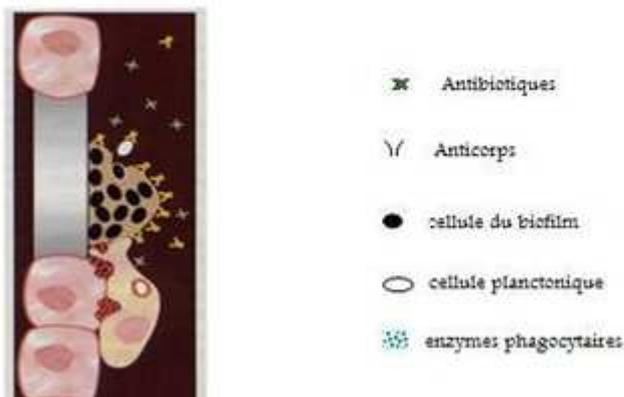
Les bactéries sessiles sont protégées de l'action des anticorps par la structure même du biofilm (rôle de la matrice). Les anticorps synthétisés éliminent alors uniquement les bactéries planctoniques qui se sont détachées du biofilm. Ils ne peuvent pas détruire les bactéries du biofilm et endommagent les tissus voisins (Costerton, 1999). Les mécanismes d'adhésion des

biofilms leur permettent d'éviter d'être éliminés au sein de l'organisme par les flux biologiques : escalator mucociliaire, sécrétions vaginales et péristaltisme intestinal par exemple. Ces communautés sessiles de micro-organismes exercent un **chimiotactisme sur les phagocytes**, qui sont alors attirés localement. Mais les biofilms sont **résistants aux anticorps, aux phagocytes et aux antibiotiques**. Les phagocytes sont donc inefficaces sur les biofilms : la phagocytose n'a donc pas lieu, mais on assiste à une **libération massive locale d'enzymes phagocytaires** (Figure 5).

**Figure 5: Mécanismes des infections chroniques causées par des biofilms : Formation d'un biofilm et résistance à la réponse immunitaire de l'hôte.**

D'après (Costerton, 1999)

Les bactéries du biofilms sont représentées par des ovales noirs, englobés dans une matrice extracellulaire figurée en beige. On observe de nombreux anticorps, représentés par des symboles en « Y », regroupés autour du biofilm. Ces derniers sont inefficaces sur les bactéries du biofilm. Par contre, ils sont efficaces contre les bactéries planctoniques (ovales blancs) qui se sont détachées du biofilm, et forme des complexes antigène-anticorps (ovale blanc accolé à un symbole en « Y » sur la figure).



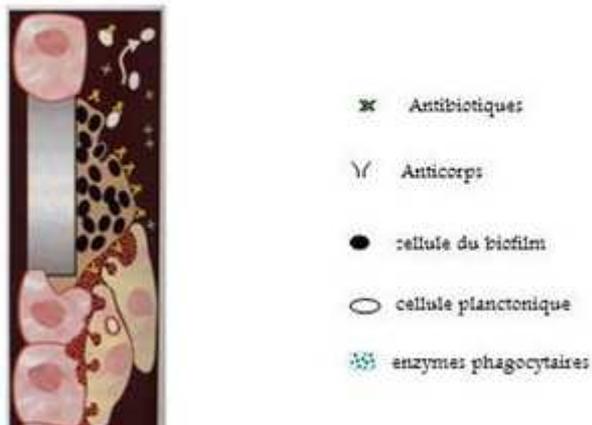
Les enzymes phagocytaires libérées localement vont **endommager les tissus avoisinants** et **éroder la surface du biofilm**, entraînant la **libération de bactéries planctoniques** qui vont essaimer à partir du biofilm. Ces dernières stimulent à nouveau les défenses immunitaires de l'hôte (sécrétion d'anticorps) et peuvent engendrer une infection de voisinage ou une dissémination de l'infection à d'autres territoires de l'organisme (Figure 6).

Les **bactéries planctoniques essaïmant** à partir de biofilms sont capables d'engendrer des **infections aigües**, cliniquement qualifiées de « rechutes » ou de « crises ». En effet, ces dernières sont capables de passer outre les défenses immunitaires de l'hôte en relarguant des **protéases**. Ces protéases digèrent les tissus de l'hôte et peuvent être assimilées à des **facteurs de virulence** (Percival, 2004 a ; Percival, 2004 b).

**Figure 6: Mécanismes des infections chroniques causées par des biofilms : Erosion du biofilm et essaïmage de bactéries planctoniques.**

D'après (Costerton, 1999)

La surface du biofilm, représenté par l'amas de bactéries (ovales noirs) englobés dans la matrice d'exopolysaccharides figurée en beige, est érodée par l'action locale des enzymes phagocytaires : des bactéries planctoniques, représentées par des ovales blancs, essaïment à partir du biofilm et vont pouvoir gagner d'autres territoires de l'organisme (trajet matérialisé par la flèche blanche en haut à droite).



On voit donc que les biofilms, en restant fixés à leur support, sont une cause importante de chronicité des infections. L'**antibiothérapie** est inefficace pour éradiquer les biofilms. On observe souvent dans ce cas la réapparition des symptômes, signant une **rechute**. Ainsi, des infections peuvent persister des années au sein d'un organisme (Costerton, 1999). Trois exemples d'infections chroniques causées par des biofilms sont présentés ci-dessous pour leur diversité et leur importance : infections à staphylocoques, biofilms formant la plaque dentaire et à l'origine de la formation de caries dentaires, et biofilms responsables de certaines infections oculaires chroniques.

#### **6.2.1.5. Infections chroniques liées à la présence de biofilms. Etude de quelques exemples**

##### **Exemple n°1 : Biofilms et infections à Staphylocoques.**

Les staphylocoques sont responsables de la grande majorité des infections causées par des biofilms. Ils sont présents en grand nombre dans la **flore commensale de la peau et des muqueuses** chez l'Homme et l'animal (Otto, 2008). Les infections associées à la présence de biofilms de *Staphylococcus aureus* sont plus difficiles à traiter et nécessitent un remplacement plus fréquent des implants médicaux que celles associées aux biofilms de *Staphylococcus epidermidis* (Jones, 2001). Les staphylocoques ne forment pas de biofilms avec d'autres espèces bactériennes. Il est rare de trouver plus d'une souche bactérienne au sein d'un même biofilm. Ceci pourrait s'expliquer par des mécanismes de quorum sensing spécifiques des staphylocoques qui inhiberaient l'expression des facteurs de virulence d'autres bactéries (Arciola, 2005). Une voie de recherche pourrait être d'abaisser la virulence de ces biofilms de staphylocoques. Par exemple, plutôt que de les détruire, les rendre hétérogènes permettrait de rebasculer vers un écosystème plus proche de la normale.

## Exemple n°2 : Biofilms de la plaque dentaire et caries dentaires.

Le biofilm formant la **plaque dentaire** à l'interface avec les gencives est fréquemment associé à la présence de gingivites et de périodontites chroniques. L'attaque permanente de polynucléaires neutrophiles dirigés contre les micro-organismes du biofilm formant la plaque dentaire entraîne une réaction inflammatoire chronique. Les médiateurs de l'inflammation, dont des cytokines, sont surexprimés et stimulent la résorption de l'alvéole dentaire ainsi que la destruction du collagène, qui sont à l'origine d'une gingivite et d'une périodontite (Teng, 2003).

Les bactéries présentes dans le biofilm formant la plaque dentaire interviennent dans des réactions de fermentation de sucres ingérés par l'individu. La fermentation de ces sucres produit des composés acides qui vont attaquer l'émail et la dentine. La dent va se déminéraliser, et une cavité va se creuser dans la dent. Une carie dentaire correspond à une destruction localisée de l'émail dentaire par des composés acides issus de la fermentation bactérienne de composés organiques (sucres). La **formation d'une carie dentaire** résulte du **déséquilibre écologique** entre la **matière minérale dentaire** et les **biofilms présents** dans la cavité buccale. Les micro-organismes rencontrés dans la plaque dentaire sont en grande majorité *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* et *Lactobacillus* spp (Selwitz, 2007).

Les produits de la dégradation bactérienne de composés organiques fermentescibles d'origine alimentaire présents dans la cavité buccale de l'individu, entraînent une **baisse importante du pH** au niveau du micro-environnement de la dent. Si la valeur du pH diminue trop et atteint une **valeur critique**, un processus de **déminéralisation de la dent** s'amorce. On peut contrer cette déminéralisation dentaire précocément en administrant du calcium, du fluor et du phosphate. La **baisse du pH** suite à l'activité du biofilm peut être **restaurée** par l'action de la **salive**. On assiste ainsi à un perpétuel mouvement de balancier entre minéralisation et déminéralisation. Enfin on précise que les caries dentaires se développent sur des dents sur lesquelles la plaque dentaire est présente depuis longtemps (Selwitz, 2007).

### **Exemple n°3 : Biofilms et infections oculaires chroniques.**

Certains biofilms bactériens sont responsables d'infections oculaires chroniques, comme la kératopathie infectieuse cristalline, appelée aussi IDK<sup>17</sup>. L'IDK est une **forme rare de kératite microbienne** caractérisée par la présence de **structures cornéennes en forme de cristaux**, associée à la présence d'un œdème cornéen. Des biofilms bactériens ont été mis en évidence dans des biopsies de cornées réalisées chez des patients atteints d'IDK : la matrice d'exopolysaccharides est colorée par le rouge Ruthénium. L'antibiothérapie est peu efficace dans le traitement de cette infection (Zegans, 2002).

#### **6.2.2. Biofilms et implants médicaux**

Des **biofilms** peuvent se former à la surface ou à l'intérieur de **dispositifs médicaux implantés dans l'organisme** : lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, pace-makers, cathéters de dialyse péritonéale, sondes de tympanostomie, sondes urinaires, prothèses vocales... 82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés ; principalement par *Pseudomonas spp.*, des staphylocoques et des entérocoques (Archibald, 1997). Ceci pose un véritable **problème de santé publique** pour les personnes nécessitant ces implants. Le traitement par antibiothérapie est difficile voire inefficace, l'essaimage de bactéries planctoniques à partir du biofilm pouvant engendrer des **infections**. Les micro-organismes responsables proviennent de la flore cutanée du patient, de l'environnement ou de la micro-flore exogène transitoire véhiculée par le personnel hospitalier. Les biofilms peuvent être composés d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes, selon le type de dispositif implanté et la durée d'implantation dans l'organisme du patient. La formation de biofilms dépend de plusieurs facteurs : nombre de cellules présentes, vitesse du flux du liquide dans lequel se trouve le dispositif, propriétés physico-chimiques de la surface (Donlan, 2001).

On va traiter différents exemples d'implants médicaux sur lesquels se forment des biofilms, et envisager les conséquences médicales encourues par le patient. On va tout d'abord s'intéresser aux biofilms se formant sur les sondes urinaires.

---

<sup>17</sup> IDK signifie « Infectious Crystalline Keratopathy ».

### 6.2.2.1. Biofilms et infections du tractus urinaire

#### 6.2.2.1.1. Pathogénie et micro-organismes impliqués

Les **infections bactériennes du tractus urinaire** sont les infections nosocomiales **les plus fréquentes**. Le risque de développer une infection urinaire augmente avec l'implantation de matériel médical comme les sondes urinaires et les stents urétraux. La pose d'une sonde urinaire est le premier facteur responsable du développement d'une infection urinaire (Hatt, 2008). Les agents pathogènes les plus fréquemment rencontrés font partie de la **flore du colon et du gros intestin** et peuvent être introduits dans le tractus urinaire suite à des **contaminations** (Tableau 3). Ces agents pathogènes vont former un biofilm sur la sonde urinaire et être à l'origine d'une infection.

**Tableau 3 : Fréquence des infections urinaires selon le type d'agent pathogène rencontré**

D'après (Emori, 1993)

| <b>Micro-organismes rencontrés</b> | <b>Pourcentage d'infections (%)</b> |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>            | 25                                  |
| <i>Enterococcus spp</i>            | 16                                  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | 11                                  |
| <i>Klebsiellia pneumoniae</i>      | 8                                   |
| <i>Candida albicans</i>            | 8                                   |
| <i>Enterobacter spp</i>            | 5                                   |
| <i>Proteus mirabilis</i>           | 5                                   |
| Staphylocoques coagulase- négatifs | 4                                   |

Les complications les plus fréquentes après la pose d'une sonde urinaire sont les infections nosocomiales du tractus urinaires, ou CAUTIs<sup>18</sup>. Dix à 50% des patients porteurs d'une sonde urinaire pendant une courte durée (7 jours) ont une infection urinaire due au développement de biofilms sur la sonde, et 100% des patients sont infectés lorsqu'ils gardent

<sup>18</sup> CAUTIs signifie « Catheter-Associated Urinary Tract Infections ».

la sonde pendant une durée supérieure à 28 jours (Stickler, 1996). Les CAUTIs sont **asymptomatiques** dans **90%** des cas : une simple bactériurie sera alors observée. Les CAUTIs peuvent devenir symptomatiques (bactériurie, pyurie...). Le patient va développer dans ce cas une cystite, une urétrite, une hyperthermie mais il peut aussi présenter des signes cliniques plus sévères : pyélonéphrite aiguë, calculs, bactériémie et lésions rénales (Jacobsen, 2008).

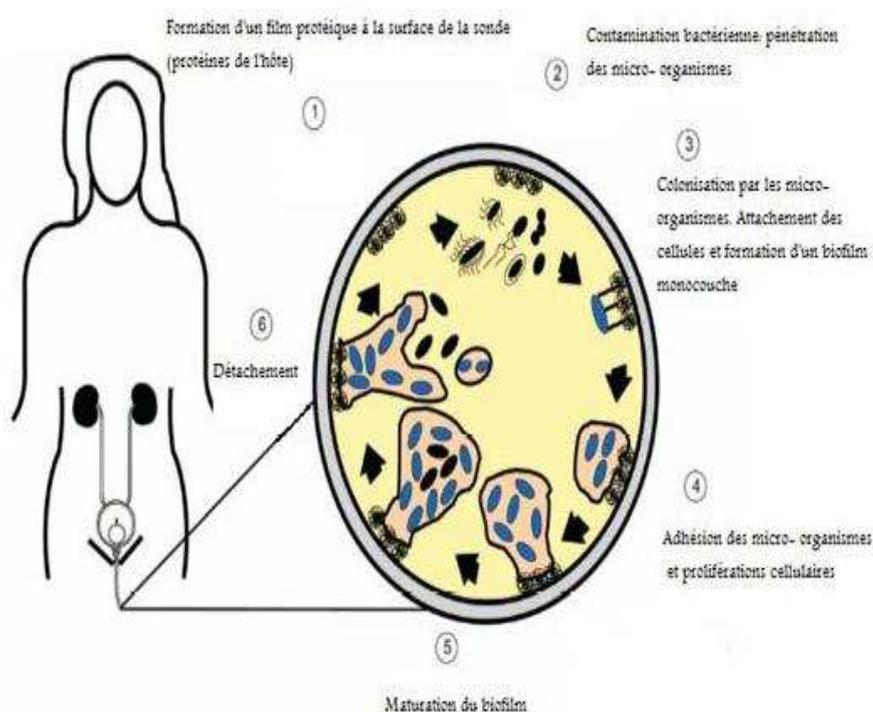
La majorité des micro-organismes responsables proviennent de la **flore cutanée** ou de la région anale (**contamination fécale**) du patient, mais aussi des **micro-flores transitoires** portées par le **personnel hospitalier**. Ce sont surtout ces dernières qui peuvent être antibiorésistantes, ce qui complique le traitement de ces infections. Lors de l'insertion de la sonde, la muqueuse urétrale peut être endommagée et son effet protecteur vis-à-vis des micro-organismes est alors altéré. Les **zones altérées de la muqueuse uro-épithéliale** suite à la pose de la sonde sont de **nouveaux sites de fixation potentiels pour les bactéries**. La **pose d'une sonde** dans de **mauvaises conditions d'hygiène** peut favoriser la **pénétration de germes dans le tractus urinaire**. La présence d'un corps étranger dans le tractus urinaire perturbe les mécanismes normaux de défense de l'hôte. La présence d'urine résiduelle dans la vessie favorise le développement bactérien (Hatt, 2008).

Le mécanisme de formation de biofilm sur une sonde urinaire est simple (Figure 7). Une fois la sonde posée, un film protéique va se déposer à sa surface et favoriser la fixation de micro-organismes (Tableau 3), et par conséquent entraîner la formation d'un biofilm. Une fois que les bactéries ont colonisé la sonde et l'uro-épithélium, elles doivent s'adapter à l'environnement formé par le tractus urinaire et se procurer des nutriments. La production bactérienne de toxines et d'enzymes dans l'environnement entraîne une dégradation des tissus avoisinants et une libération de nutriments (Jacobsen, 2008).

## Figure 7: Mécanismes de formation de biofilms sur une sonde urinaire lors d'une infection du tractus urinaire liée au port de la sonde

D'après (Jacobsen, 2008), avec accord

La structure ovale grise au centre de la figure matérialise une sonde urinaire. Un film protéique, représenté par un alignement de disques noirs, se forme à la surface de la sonde (1). Puis, des micro-organismes (éléments figurés en noirs) pénètrent dans l'organisme (2), se fixent à la surface de la sonde et forment un biofilm monocouche (3). Puis, les phases de croissance et de maturation du biofilm ont lieu (4) & (5), et enfin les bactéries se détachent et essaient à partir du biofilm (6).



### 6.2.2.1.2. Formation de biofilms cristallins. Complications

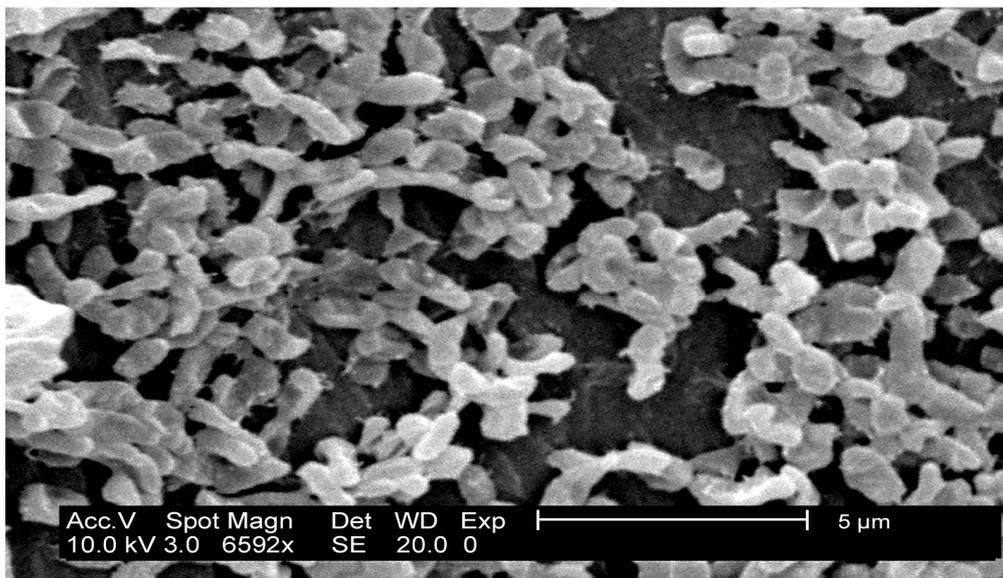
Certains micro-organismes présents dans les biofilms formés sur les sondes urinaires produisent des **uréases**, entre autres : *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* et *Klebsiella pneumoniae* (Clutterbuck, 2007 ; Hatt, 2008). L'urée contenue dans l'urine du patient est hydrolysée par les uréases bactériennes et conduit à la formation d'hydroxyde d'ammonium. La libération d'ammoniaque sous forme libre dans l'urine entraîne une **augmentation du pH** au niveau de l'**interface biofilm-urine** et conduit à la **précipitation de cristaux** d'hydroxyapatite (cristaux de phosphate de calcium) et de struvite

(phosphate ammoniaco-magnésien), qui vont venir **obstruer la lumière de la sonde** (Tunney, 1999). Les cristaux formés s'entraînent dans le biofilm : il y a formation d'un **biofilm cristallin**. La présence de cristaux va créer des **troubles urinaires** : dysurie, strangurie, hématurie, distension vésicale, oligo-anurie... On peut aussi avoir des conséquences plus sévères comme des infections ascendantes par exemple des pyélonéphrites (Hatt, 2008). *Proteus mirabilis* est l'agent le plus fréquemment à l'origine de la formation de biofilms cristallins (Photographie 3), puisque cette bactérie produit une uréase **6 à 10 fois plus efficace** que les autres uréases bactériennes (Tenke, 2006).

**Photographie 3 : Biofilms de *Proteus mirabilis* (ATCC 29906) sur du polycarbonate, obtenu par des réacteurs du Centers for Disease Control and Prevention. (Microscopie confocale à balayage)**

Photographie de Janice Car, Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Image Library, Atlanta, GA USA. Avec accord.

La photographie a été obtenue par microscopie confocale à balayage. Les structures allongées et incurvées représentent des biofilms de *Proteus mirabilis*.



La **persistance des infections au sein du tractus urinaire** s'explique par le fait que les bactéries résistent aux mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, via la production de capsules, de protéases dirigées contre le complément et les peptides anti-microbiens et de lipopolysaccharides (Jacobsen, 2008).

La **pose aseptique d'une sonde urinaire** par du personnel médical qualifié et des méthodes de **cathérisation alternative** permettant de diminuer les traumatismes de la muqueuse urétrale sont aussi des moyens efficaces pour empêcher la formation de biofilms (Jacobsen, 2008).

Des biofilms se forment donc au niveau de dispositifs médicaux comme les sondes urinaires, et sont à l'origine d'infections nosocomiales, le plus souvent difficiles à traiter. Des biofilms peuvent aussi se former sur d'autres types de prothèses médicales, comme par exemple les cathéters veineux centraux.

#### **6.2.2.2. Biofilms et cathéters veineux centraux**

Les **cathéters veineux centraux** sont les **implants médicaux les plus à risque** par rapport au développement d'une **infection** nosocomiale (Klevins, 2005). Ceci pose de graves problèmes de santé publique puisque les **traitements systémiques** de routine des patients atteints d'infections de ce type se révèlent le plus souvent **inefficaces** (Donlan, 2008).

Les micro-organismes en cause proviennent de la **flore cutanée du patient**, de la **micro-flore exogène du personnel** hospitalier, ou encore d'**environnements contaminés**. Les micro-organismes atteignent le cathéter **par migration à partir de la peau** le long de la partie externe du cathéter. Les micro-organismes les plus fréquemment isolés sont (Tableau 4): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae* (Donlan, 2001 ; Donlan, 2008).

**Tableau 4: Liste de micro-organismes isolés à partir de biofilms formés sur des cathéters veineux centraux**

D'après (Donlan, 2008)

| <b>Bactéries Gram- positives</b>                            | <b>Bactéries Gram- négatives</b>   | <b>Autres micro- organismes</b> |
|---|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Corynebacterium spp</i>                                  | <i>Acinetobacter spp</i>           | <i>Candida spp</i>              |
| <i>Enterococcus spp</i>                                     | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | <i>Candida albicans</i>         |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                                | <i>Acinetobacter anitratus</i>     | <i>Candida tropicalis</i>       |
| <i>Enterococcus faecium</i>                                 | <i>Enterobacter cloacae</i>        | <i>Mycobacterium chelonae</i>   |
| <i>Staphylococcus spp</i>                                   | <i>Enterobacter aerogenes</i>      |                                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                                | <i>Eschrichia coli</i>             |                                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>résistant à la méthicilline | <i>Klebsiella pneumoniae</i>       |                                 |
| Staphylocoques coagulase<br>négatifs                        | <i>Klebsiella oxytoca</i>          |                                 |
| <i>Streptococcus spp</i> $\alpha$ -<br>hémolytiques         | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      |                                 |
| <i>Streptococcus spp</i> (viridans<br>streptococci)         | <i>Proteus spp</i>                 |                                 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                             | <i>Providencia spp</i>             |                                 |
|   | <i>Serratia marcescens</i>         |                                 |

La **colonisation** bactérienne a lieu dans les **24 heures suivant la pose du cathéter** (Donlan, 2008). Au contact du flux sanguin, la surface du cathéter se recouvre d'un **film protéique** (plaquettes, plasma, fibronectine, laminine, ou fibrine). La présence de ce dernier va **modifier les propriétés physico-chimiques** de la surface du cathéter et **favoriser la formation de biofilms**, et ce **dès 3 jours après la pose du cathéter** (Donlan, 2008). La **localisation** et l'**extension du biofilm** sur le cathéter dépend de la **durée de la cathéterisation**. Les **cathéters de courte durée** (inférieure à 10 jours) ont des biofilms au

niveau de la **partie externe du cathéter** et que les **cathéters de longue durée** (30 jours) ont des biofilms plutôt au niveau de la **lumière du cathéter** (Raad, 1993).

Une étude a évalué l'efficacité d'antibiotiques (vancomycine et gentamicine) dans le traitement de la bactériémie liée à la présence d'un cathéter chez des patients hémodyalisés. Le traitement antibiotique a été efficace dans seulement 32% des cas, ce qui suggère que **les traitements systémiques anti-microbiens ne sont pas un moyen efficace de juguler la formation de biofilms sur les cathéters** (Marr, 1997). Mais l'éradication des biofilms reste possible. Celle-ci dépend de la nature des micro-organismes composants le biofilm, de l'âge du biofilm, de l'agent anti-microbien utilisé et de la durée du traitement. Des stratégies autres que les traitements systémiques de routine ont été mises en place. On peut citer parmi elles la **thérapie anti-microbienne de verrouillage** (cf page 85). Brièvement, cette thérapie consiste en l'instillation de fortes concentrations d'agents anti-microbiens directement dans le cathéter colonisé par les biofilms, pendant une durée suffisante, afin d'éradiquer le biofilm (Donlan, 2008). Il faut cependant faire très attention à l'apparition d'éventuelles **résistances**. Pour l'instant, le meilleur moyen de lutter contre les biofilms réside dans la rigueur des conditions d'hygiène dans le milieu hospitalier (cf page 80) (Maki, 1994).

### **6.2.2.3. Biofilms et valves cardiaques artificielles**

Des biofilms peuvent se former sur des prothèses de valves cardiaques. Les principaux micro-organismes responsables sont : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp.* et *Candida albicans*. Ces micro-organismes proviennent de la **peau**, d'**implants médicaux** comme les cathéters veineux centraux ou ont une **origine dentaire** (Donlan, 2001).

Le geste chirurgical permettant l'implantation d'une valve cardiaque artificielle induit des lésions tissulaires. Des plaquettes et de la fibrine ont tendance à s'accumuler au niveau de la zone d'implantation de la valve. Les biofilms rencontrés se forment plutôt au niveau des tissus avoisinants la prothèse ou des sutures que sur la valve en elle-même (Karchmer, 1994). Des biofilms peuvent aussi se former sur des broches et être à l'origine d'ostéomyélite.

#### 6.2.2.4. Biofilms et ostéomyélite

L'ostéomyélite est une infection de l'os, retrouvée majoritairement au niveau des os longs. *Staphylococcus aureus* est le germe le plus fréquemment mis en cause. Les agents pathogènes responsables des ostéomyélites se développent sous forme de **biofilms**. La présence d'**implants** dans l'os est un **facteur prédisposant** à la **formation de biofilms**, puisqu'ils sont recouverts de protéines de l'hôte juste après leur implantation. Cette couche protéique formée sur l'implant forme un substrat qui favorise l'attachement des bactéries et le développement de biofilms (Brady, 2008).

L'éradication des biofilms est problématique, compte tenu de leur résistance à l'action des agents anti-microbiens. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont envisagées, comme l'utilisation d'anticorps anti-polysaccharides de la matrice ou encore des modifications de la surface des implants, permettant d'éviter la fixation des bactéries (Brady, 2008). Le **traitement le plus efficace** des ostéomyélites associées à la présence de biofilms reste le traitement chirurgical, consistant en un **débridement large des tissus infectés** (Brady, 2008).

#### 6.2.2.5. Biofilms et prothèses oculaires

Les études concernant le rôle des biofilms dans les infections oculaires sont récentes et incomplètes, et beaucoup sont uniquement descriptives. Un grand nombre d'hypothèses sont proposées mais elles n'ont pas encore été vérifiées. Les biofilms bactériens joueraient un **rôle non négligeable** dans les **infections bactériennes oculaires** (Zegans, 2002). Ils peuvent être présents sur des matériaux placés sur l'œil ou dans l'œil, comme les lentilles de contact, les lentilles intraoculaires et les fils de suture. Comprendre le rôle des biofilms bactériens dans les infections oculaires pourrait guider les recherches et le développement de nouvelles stratégies antimicrobiennes spécifiques à l'ophtalmologie.

Aux Etats-Unis, 56% des ulcères cornéens diagnostiqués sont associés au port de lentilles de contact (Zegans, 2002). L'incidence des kératites bactériennes est plus élevée chez les porteurs de lentille de contact que dans la population générale. La contamination bactérienne ne dépend pas du type de lentilles utilisées (dures ou souples) ou du type de produit de décontamination utilisé. Le **port de lentilles de contact** favorise le **développement d'infections cornéennes** en induisant une **hypoxie cornéenne**, une

**hypercapnie** et des **lésions de l'épithélium cornéen**. Les lentilles de contact offrent aussi une surface sur laquelle les bactéries peuvent se fixer et former des biofilms (Zegans, 2002).

L'une des complications les plus sérieuses faisant suite à la pose d'une lentille intraoculaire lors de chirurgie correctrice de cataracte est l'**endophtalmie**. Cette complication post-opératoire est très rarement rencontrée : entre 0,1 et 0,3% (Garcia-Saenz, 2000). Aux Etats-Unis, *Staphylococcus epidermidis* est retrouvé dans 70% des cas d'endophtalmie aigüe en complication post-opératoire de chirurgie de cataracte. La formation de biofilms sur la lentille intraoculaire placée lors de la chirurgie pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de l'endophtalmie. Elle constitue en effet une surface abiotique sur laquelle des biofilms peuvent se fixer. Par le biais de cette fixation, les bactéries échappent aux mécanismes d'élimination des bactéries ayant lieu dans la chambre antérieure de l'œil.

Les bactéries responsables de l'endophtalmie proviennent de la peau péri-oculaire et des cils (Zegans, 2002).

#### **6.2.2.6. Conclusion : biofilms et infections nosocomiales liées au port d'implant**

La présence d'implants médicaux favorise la formation de biofilms et est à l'origine d'infections nosocomiales, souvent difficiles à traiter du fait de leurs propriétés d'antibiorésistance (Figure 8).

## Figure 8 : Biofilms et infections nosocomiales : pourquoi le traitement médical est souvent inefficace ?

D'après (Utili, 2007), avec accord.

La présence de biofilms sur des implants médicaux est à l'origine d'infections nosocomiales, souvent difficiles à traiter. Les biofilms sont plus résistants à la réponse immune de l'hôte que leurs congénères sous forme planctonique : l'efficacité de la phagocytose est donc diminuée en présence de biofilms. De plus, les bactéries sous forme de biofilms sont 10 à 1000 fois plus résistantes à l'action des agents anti-microbiens que celles sous forme planctonique. Ainsi, les propriétés pharmacodynamiques des agents microbiens sont altérées en présence de biofilms : ils sont donc peu efficaces. Ainsi, la présence de biofilms engendre simultanément une diminution de l'efficacité de la réponse immune de l'hôte et des agents anti-microbiens, ce qui rend l'infection difficile à traiter. Sur la photographie de gauche, on observe des biofilms de *Staphylococcus aureus*, avec une structure caractéristique en champignon. Sur la photographie de droite, on observe des structures filamenteuses fixées sur des surfaces cylindriques (implant médical) : il s'agit de biofilms de *Pseudomonas* spp.

### Mécanismes de défense de l'hôte

Phagocytose ralentie

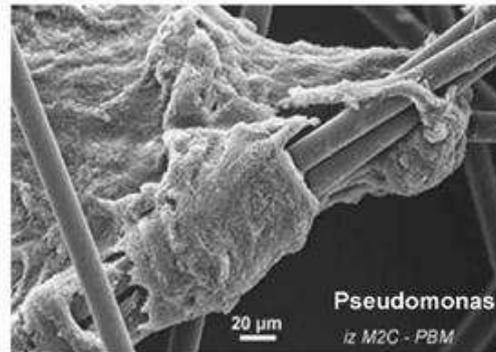
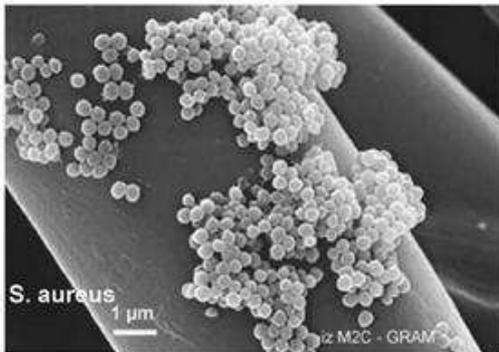
Inefficace

### Agents anti-microbiens

Diminution de l'efficacité

Antibiorésistance 10 à 1000 fois plus élevée pour les bactéries sous forme de biofilms, par rapport à leurs congénères planctoniques

**Biofilm bactérien formé sur un implant médical**



**Altération des paramètres pharmaco-dynamiques**

Les biofilms sont rencontrés aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. Les données issues de la médecine humaine peuvent souvent être appliquées à la médecine vétérinaire, ce qui nous donne une base de travail ainsi que des outils conceptuels que nous pouvons étendre à l'ensemble des mammifères.

### 6.2.3. Biofilms et médecine vétérinaire

#### 6.2.3.1. Biofilms et transmission vectorielle d'agent pathogène par un vecteur biologique

Des biofilms formés de micro-organismes pathogènes peuvent être transmis d'un individu à un autre par des vecteurs biologiques. Nous traiterons ici essentiellement de l'exemple de la transmission vectorielle par la puce de biofilms de *Yersinia pestis*, agent responsable de la peste bubonique.

*Yersinia pestis*, agent de la peste bubonique, se transmet par des piqûres de puces, à partir d'animaux infectés, le plus souvent des rongeurs. Récemment, des études ont démontré que la puce jouait aussi le rôle de **vecteur biologique** dans la transmission de la peste, et n'était pas uniquement un hôte passif permettant une contamination purement mécanique (Jarrett, 2004 ; Hinnebusch, 2008).

La peste est une maladie qui **réapparaît de façon périodique**, à partir du **réservoir des animaux sauvages**, en particulier les **rongeurs**. Les rongeurs se contaminent en creusant la terre, on parle de « peste de fouissement ». Après infection des premiers rongeurs par fouissement, la maladie se propage entre animaux **par piqûres de puces**. La puce du rat, *Xenopsylla cheopis*, transmet la bactérie de rat à rat (Toma, 2007). *Yersinia pestis*, agent de la peste, est une bactérie Gram-négative, membre de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'un agent pathogène important chez l'Homme et les autres mammifères ; c'est l'un des micro-organismes les plus virulents que l'on connaisse.

On distingue plusieurs types de transmissions de *Yersinia pestis* (Hinnebusch, 2008). Le premier mode de transmission est la **transmission mécanique** dans laquelle la puce est un **hôte passif**. Une puce provenant d'un animal infecté pique un animal sain et dépose dans le derme de l'animal sain, lors d'un repas sanguin, des bactéries contenues dans les résidus du repas sanguin précédent. La puce joue donc un rôle purement mécanique ; ce n'est pas un vecteur biologique dans ce cas (Hinnebusch, 2008).

Le second mode de transmission est la **transmission vectorielle**, dans laquelle la puce est un **hôte biologique**. Dans ce cas, la puce joue le rôle de **vecteur biologique**. On rappelle qu'un vecteur actif ou biologique est un arthropode qui transmet un agent pathogène après en avoir assuré la multiplication. La peste peut alors être classée parmi les **arboviroses**. En effet, l'agent pathogène est ingéré par la puce, puis il va se multiplier et **former un biofilm au**

**niveau de son intestin.** Les bactéries sont localisées au niveau de l'**intestin** ou du **pro-ventricule** (valve connectant l'œsophage à la portion antérieure de l'intestin) et sont déversées de façon séquentielle lors du repas sanguin. Lors d'une piqûre, la puce va **rejeter dans le derme** de l'individu parasité de la **salive contenant des bactéries** (Hinnebusch, 2008).

Immédiatement après avoir été ingérées par la puce, les bactéries *Yersinia pestis* forment un **agrégat**, flottant librement dans la lumière de la partie antérieure de son intestin. Les bactéries n'adhèrent pas à l'épithélium et sont donc, dans la plupart des cas, rejetées dans les fèces, puisque les puces se nourrissent et défèquent très fréquemment. On observe ainsi que de nombreuses puces infectées, après œuvre du transit digestif, ne contiennent plus de bactéries. Par contre, la présence d'agrégats bactériens importants ne pouvant pas être éliminés dans les fèces à cause de leur taille importante, peuvent causer durablement une infection. Puis, il peut y avoir **fixation de ces agrégats bactériens aux parois du pro-ventricule** de la puce et **formation d'un biofilm**. La synthèse préalable d'une matrice extracellulaire est nécessaire à la constitution de ce biofilm. Cette matrice extracellulaire est visqueuse et très hétérogène : elle incorpore des molécules présentes dans l'environnement proche du lieu de formation du biofilm, autrement dit le tube digestif de la puce, par exemple des lipides issus du repas sanguin. La matrice extracellulaire pourrait jouer un **rôle de protection** des bactéries lors du contact initial avec les défenses immunitaires de l'hôte, au niveau cutané (lieu de la piqûre) (Hinnebusch, 2008).

**Le même mode de transmission vectorielle par un arthropode** d'un agent pathogène sous forme de biofilms est retrouvé pour les protozoaires du genre *Leishmania* (agent de la leishmaniose) et pour *Xylella fastidiosa*, agent de maladies chez les végétaux, comme la maladie X du citrus (Hinnebusch, 2008).

### **6.2.3.2. Biofilms et infections nosocomiales chez les animaux**

Les infections bactériennes chez les animaux sont fréquentes mais leur rapport avec la présence ou non de biofilms est rarement évoqué. Les biofilms sont impliqués dans diverses maladies animales : pneumonie, abcès hépatiques, entérites, plaies infectées, mammites... Ces affections sont causées par des micro-organismes présents dans l'environnement, comme *Pseudomonas aeruginosa*, ou des micro-organismes de la flore commensale des animaux (Clutterbuck, 2007).

Les données concernant les infections nosocomiales liées à la présence de biofilms sur des implants médicaux peuvent aussi s'étendre à la médecine vétérinaire, puisqu'on retrouve tous les éléments propices à leur formation.

Prenons l'exemple de biofilms de *Staphylococcus aureus*. Il s'agit de l'une des causes les plus importantes de **mammites** subcliniques, cliniques et chroniques chez les animaux de rente. Cette bactérie fait partie de la flore cutanée du cheval et est rencontrée aussi au niveau des sabots. Lorsqu'elle est sous forme de biofilms, elle est responsable d'infections de plaies post-opératoires et de mammites chez le cheval (Clutterbuck, 2007).

*Acinetobacter baumannii* est une bactérie commune rencontrée dans l'environnement et dans la flore cutanée et des muqueuses chez les animaux. Cette bactérie, lorsqu'elle est sous forme de biofilms, est impliquée dans des infections nosocomiales chez des chiens et des chats (Francey, 2000). Elle a été isolée dans des cathéters utilisés chez des chevaux (Vanechoutte, 2000).

#### **6.2.4. Biofilms et antibiorésistances**

L'antibiorésistance développée par les biofilms bactériens pose de sérieux problèmes en matière de santé publique, puisqu'elle rend difficile le traitement des infections dues à des biofilms. L'antibiorésistance d'une bactérie vivant sous forme de biofilm est 10 à 1000 fois plus élevée qu'une bactérie de la même espèce vivant sous forme planctonique (Mah, 2001). Cependant, **tous les biofilms ne manifestent pas une insensibilité aux traitements antibiotiques** (Conley, 2003).

Les mécanismes d'antibiorésistance mis en œuvre par les bactéries au sein des biofilms sont nombreux et variés. Anderson et O'Toole font une dichotomie nette entre **facteurs de résistance innés** et **facteurs de résistance induits** par le contact avec les antibiotiques (Anderson, 2008).

##### **6.2.4.1. Facteurs de résistance innés**

Le passage de la vie planctonique à la vie sous forme de biofilm s'accompagne de l'acquisition d'une résistance des bactéries aux antibiotiques. Les facteurs innés de résistance aux antibiotiques font partie intégrante de la structure du biofilm et de sa physiologie.

### Role de la matrice.

Les antibiotiques doivent traverser une épaisse couche constituée d'exopolysaccharides, d'ADN et de protéines afin de pouvoir atteindre leurs cellules-cibles. Même si la matrice stoppe certaines molécules d'antibiotiques, d'autres molécules vont franchir cette barrière et pénétrer au sein du biofilm. Certaines concentrations faibles en antibiotiques stimulent la production d'exopolysaccharides de la matrice et contribuent à accroître son épaisseur (Donlan, 2002 ; Anderson, 2008 ; Conley, 2003 ; Clutterbuck, 2007).

L'efficacité du rôle de la matrice dans les mécanismes d'antibiorésistance peut être étudiée en termes de durée du traitement antibiotique. La matrice peut séquestrer des antibiotiques hydrophobes et chargés positivement, comme les aminoglycosides. Ce mécanisme de limitation de la pénétration des agents anti-microbiens au sein d'un biofilm explique les antibiorésistances observées lors d'administration unique d'antibiotiques mais n'est pas valable pour les antibiothérapies de longue durée (Gilbert, 2001).

Néanmoins, la pénétration limitée des antibiotiques au sein des biofilms n'est pas considérée comme le mécanisme d'antibiorésistance le plus important (Anderson, 2008). Il existe des mécanismes de protection active contre les antibiotiques, par opposition à la protection passive qu'offre la matrice d'exopolysaccharides : c'est le cas des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, qui expulsent activement des composés anti-microbiens grâce à la présence de pompes d'efflux (Costerton, 1999).

### Insuffisance des conditions nutritives. Entrée en métabolisme ralenti.

Lorsque les **conditions nutritives sont insuffisantes** (privation ou concentrations faibles en oxygène et en nutriments) les bactéries du biofilm entrent dans une **phase de croissance ralentie** voire en **hypobiose** (Costerton, 1999). En effet, la privation en oxygène et en nutriments entraîne une forte diminution de l'activité métabolique bactérienne. Cette **diminution de leur activité métabolique** rend les bactéries des biofilms, en particulier celles situées dans les couches profondes du biofilm, **moins sensibles à l'action des agents anti-microbiens** (Costerton, 1999 ; Donlan & Costerton, 2002). Par contre, les cellules superficielles à haut métabolisme et à divisions rapides seront détruites par les antibiotiques qui auront réussi à franchir la matrice.

La baisse de l'oxymétrie entraîne non seulement une baisse du métabolisme des cellules du biofilm mais est aussi à l'origine d'autres modifications. La résistance des

bactéries des biofilms dans des conditions de basses concentrations en oxygène peut s'expliquer par le fait que **certains antibiotiques** ne sont **pas actifs en absence d'oxygène**, comme par exemple la ciprofloxacine ou la tobramycine (Zabinski, 1995). D'autre part, certains **groupes de gènes** sont **activés** par de **basses concentrations en oxygène**, et sont à l'origine de modifications phénotypiques permettant une **résistance accrue** aux agents antimicrobiens. Des concentrations réduites en oxygène engendrent des modifications phénotypiques à l'origine d'une diminution de sensibilité aux agents anti-microbiens (Drenkard, 2003).

Ainsi, l'entrée dans un **métabolisme ralenti protège** les bactéries **de l'action des antibiotiques**. En diminuant leur croissance et leur métabolisme et en activant des facteurs de réponse aux stress environnementaux (anaérobiose, pauvreté en éléments nutritifs), les bactéries des biofilms **augmentent leurs chances de survivre à des traitements antibiotiques**.

### **Présence de variants phénotypiques.**

Un autre mécanisme proposé pour l'explication de l'antibiorésistance au sein des biofilms est la présence de **variants phénotypiques** dits « **persistants** », parfois appelés « cellules persistantes » (Drenkard, 2002). Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent des variants phénotypiques capables de croître normalement en présence de fortes concentrations en antibiotiques. Une protéine régulatrice détermine quelles cellules seront résistantes au sein du biofilm. Il s'agit d'un mécanisme de contrôle « en tout ou rien », qui permet à des bactéries de s'adapter à un grand nombre de conditions environnementales. Ces variations phénotypiques sont **réversibles** et apparaissent de façon très **fréquente** et **aléatoire**, conduisant à l'obtention de **populations extrêmement hétérogènes** d'un point de vue phénotypique (Lewis, 2008). L'hétérogénéité de phénotypes au sein de populations augmente la probabilité de constater une résistance bactérienne lors de changements environnementaux soudains (Drenkard, 2002).

La persistance de ces cellules est due à une **altération des mécanismes de mort programmée**. Selon cette théorie, les agents antimicrobiens tueraient indirectement les bactéries en causant des dommages intracellulaires qui déclencheraient alors les processus de mort programmée. Sur des cellules possédant une altération de leur mécanisme de mort

programmée, l'action des antibiotiques n'a aucun effet et ces cellules persistent (Lewis, 2001).

Selon les auteurs, on trouve des théories différentes concernant la notion de cellules persistantes. Certains considèrent que ces cellules sont résistantes à l'action des antibiotiques, d'autres, comme Lewis, soutiennent que ces dernières sont en fait **tolérantes** à l'action des antibiotiques. Pour cet auteur, les biofilms ne croissent pas en présence de concentrations élevées d'antibiotiques, c'est-à-dire qu'il n'y aurait **pas de phénomènes de résistance** comme c'est le cas pour les bactéries planctoniques (Lewis, 2001). Il propose que la plupart des cellules d'un biofilm, quelques soient leur vitesse de croissance et la rapidité de leurs divisions cellulaires, sont **très sensibles à l'action d'agents bactéricides** comme les fluoroquinolones par exemple. Il existe une petite population de cellules qui survivent quelque soit la concentration d'antibiotiques dans le milieu. Ces cellules sont appelées **cellules persistantes**, Ceci permet de définir un **modèle de fonctionnement d'un biofilm**. Ce modèle est le suivant : un traitement antibiotique va éliminer les bactéries planctoniques et la majorité des cellules du biofilm. Le système immunitaire de l'hôte va détruire les cellules persistantes sous forme planctoniques. Les **cellules persistantes du biofilm** sont protégées par la matrice d'exopolysaccharides ; elles **restent intactes** et vont permettre de régénérer par la suite le pool de cellules constituant le biofilm, assurant ainsi le **maintien du biofilm**. Ces cellules persistantes développent selon Lewis une tolérance<sup>19</sup> aux antibiotiques.

On a pu isoler des cellules persistantes, séquencer leur transcriptome<sup>20</sup> et trouver des candidats au statut de gènes codant pour des caractères de tolérance. L'étude du profil génétique d'expression des cellules persistantes révèle une diminution de la synthèse des protéines impliquées dans la production d'énergie et dans les fonctions non vitales comme la

---

<sup>19</sup> Pour mieux comprendre ce phénomène, rappelons brièvement quelques définitions. Un antibiotique est une substance bactéricide ou bactériostatique, dirigé contre une cellule-cible. Lorsque l'antibiotique se fixe à une cellule-cible, il détourne son métabolisme: la cellule-cible synthétise contre son gré une molécule toxique, qui va entraîner sa destruction. Les mécanismes de **résistance** (mutation, modification de la cellule cible, perméabilité réduite aux antibiotiques...) **empêchent** un antibiotique de **se fixer à ses cellules-cibles**. Les phénomènes de résistance aux antibiotiques ont pour conséquence une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (CMI). La **tolérance** d'une bactérie à un antibiotique se définit de la façon suivante : l'antibiotique se fixe à la cellule-cible mais il n'y a **pas de production de molécule toxique**. La cellule-cible n'est donc pas détruite, malgré la présence de l'antibiotique. L'antibiotique va donc se lier aux récepteurs de la cellule-cible mais il ne va pas pouvoir la corrompre. Le changement de phénotype se fait de façon **aléatoire**.

<sup>20</sup> Ensemble des ARN messagers d'une cellule

synthèse des flagelles. Ceci suggère que les cellules persistantes sont des **cellules dormantes**. On a aussi pu mettre en évidence l'existence de **gènes codant pour des protéines induisant une vie ralentie** : inhibition de la traduction et/ou de la réplication du matériel génétique. La PlsB est une protéine bactérienne, dont le gène contient des séquences très conservées, joue aussi un rôle dans la tolérance aux antibiotiques. La persistance des cellules dépend de leur aptitude à conserver l'intégrité de leur membrane, par des mécanismes dépendants de la PlsB dans le cadre de la synthèse de phospholipides (Lewis, 2008). Les caractères de résistance aux antibiotiques sont transmissibles. On dispose de peu de données, mais on peut penser que la tolérance à un antibiotique se transmet génétiquement. La tolérance à un antibiotique peut entraîner des sélections de mutants résistants. On rencontre aussi des populations de cellules persistantes au sein de biofilms de levures, notamment dans les biofilms de *Candida albicans* tolérants aux antibiotiques (Lewis, 2008).

### **Synthèse de molécules spécifiques.**

Certains polysaccharides peuvent se lier aux antibiotiques et les empêcher de pénétrer au sein du biofilm. C'est le cas de l'**alginate**, un exopolysaccharide produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit d'un polymère anionique : il capte facilement les molécules cationiques, comme par exemple les aminoglycosides ou aminosides, et les inhibe. Les alginates produits par *Pseudomonas aeruginosa* durant les étapes de formation du biofilm réduisent la phagocytose leucocytaire (Leid, 2005).

Il existe d'autres facteurs spécifiques de biofilms intervenant dans la résistance aux antibiotiques, comme par exemple l'enzyme codée par le gène *ndvB* chez *Pseudomonas aeruginosa*. Elle est impliquée dans la synthèse de glycanes cycliques, qui se lient à l'antibiotique (principalement la tobramycine), le séquestrent et empêchent la destruction de la bactérie (Mah, 2003).

**L'altération de l'expression de certains gènes** expliquerait l'apparition de phénotypes présentant une susceptibilité réduite aux agents anti- bactériens (Cochran, 2000). Des transferts de caractères de résistance de cellule à cellule permettent d'expliquer l'apparition d'antibiorésistances au sein de biofilms (Andrel, 2000).

#### 6.2.4.2. Facteurs de résistance induits

Les mécanismes à l'origine de l'expression de facteurs de résistance induits sont **mal connus** car peu d'études ont été menées afin de déterminer et d'identifier les facteurs de résistance induits par les antibiotiques au sein de biofilms. On sait qu'un grand nombre de gènes est impliqué (Lewis, 2008).

L'expression de facteurs induits de résistance à un antibiotique est **stimulée par l'exposition** d'une population de bactéries à **cet antibiotique**, qui constitue un stress important pour ces dernières. Au sein d'un biofilm exposé à un antibiotique se crée un gradient d'antibiotique, qui décroît quand on approche des couches profondes du biofilm. Ce gradient entraîne l'expression différentielle de facteurs de résistance induits, selon l'endroit où l'on se trouve dans le biofilm. Ces facteurs induits viennent compléter l'action des facteurs de résistance innés (Lewis, 2008). Enfin, le **quorum sensing** jouerait un rôle dans l'établissement d'antibiorésistance au sein de biofilms, mais cette hypothèse reste assez controversée. Les molécules du quorum sensing contrôlent l'expression de facteurs de virulence extracellulaire mais leur rôle dans l'établissement d'une antibiorésistance est mal connu (Clutterbuck, 2007).

#### 6.2.4.3. Moyens de lutte contre les antibiorésistances des biofilms

Quelques soient les mécanismes de résistance, lorsqu'on traite une infection bactérienne chez l'Homme ou chez l'animal, il est important de sélectionner l'antibiotique adéquat, non seulement au début du traitement mais de façon continue, afin d'éviter la sélection de mutants résistants à l'antibiotique utilisé.

Le challenge est de développer de nouveaux traitements et de nouveaux moyens de lutte contre la tolérance des bactéries aux antibiotiques. Les nouvelles stratégies de lutte contre les antibiorésistance des biofilms sont les suivantes : thérapies combinées, ingestion d'antibiotiques sous forme inactive, utilisation de matériel médical stérile ou recouvert d'agents anti-microbiens (cf page 82). Les antiseptiques éliminent de façon satisfaisante les cellules persistantes mais sont toxiques et ne peuvent être utilisés par voie systémique. On peut imprégner la surface d'implants médicaux d'agents anti-microbiens. Lorsqu'une molécule antimicrobienne est fixée à une surface, elle perd sa mobilité et n'est donc plus capable de s'attaquer à un agent pathogène. Une solution à ce problème serait de fixer l'antibiotique à une longue chaîne de polymères qui serait directement liée au substrat (Lewis, 2008).

### **6.3. Importance industrielle des biofilms**

Les biofilms ont une importance médicale considérable, mais ils jouent aussi un rôle dans le monde de l'industrie. On va tout d'abord s'intéresser aux effets bénéfiques offerts par les biofilms, et voir comment ces derniers sont exploités industriellement.

#### **6.3.1. Effets bénéfiques de la présence de biofilms**

Si la présence de biofilms a des effets néfastes dans les secteurs agro-alimentaire ou médical, ces derniers peuvent également être mis à profit, par exemple dans les procédés de traitement des eaux usées (auto-épuration des lacs, système des boues activées dans certaines stations d'épuration), ou encore dans le domaine industriel par leurs propriétés de **synthèse de certaines substances chimiques** (éthanol, poly-3-hydroxybutyrate, benzaldéhyde) ou leurs propriétés anti-corrosion. En effet, la formation de biofilms hautement résistants confère aux matériaux qu'ils recouvrent des **propriétés anti-corrosives** (Wanner, 2006). Enfin, les biofilms peuvent jouer le rôle de véritables **bio-indicateurs de pollution** (Wanner, 2006).

Les micro-organismes sont capables de dégrader les polluants présents dans les effluents : ils jouent un rôle important dans **l'épuration des eaux**. Certaines bactéries, comme les cyanobactéries, présentes dans des cours d'eau ou des lacs jouent un rôle non négligeable dans le **cycle des métaux**, dont elles sont en mesure de réduire les concentrations dans l'eau. Elles participent donc activement à l'activité **d'auto-épuration des lacs** (Wanner, 2006).

Les biofilms peuvent être utilisés de façon ciblée afin d'épurer des nappes phréatiques souterraines contaminées, à la suite par exemple de **pollutions chimiques accidentelles**. Si les polluants sont biodégradables, on peut injecter dans l'aquifère concerné des micro-organismes spécifiques dans l'espoir qu'ils forment des biofilms et utilisent les **polluants** comme **source d'énergie pour leur métabolisme**, à défaut d'autres substrats (Wanner, 2006). L'eau potable que nous buvons provient à 70% de réserves souterraines d'eau. Les biofilms présents dans le sous-sol réalisant une **épuration naturelle** de l'eau lors de son passage sous terre, avant d'être captée.

Dans le procédé des **boues activées**, les bactéries forment des biofilms (jusqu'à une taille de 2 mm !), contenant des millions de bactéries, maintenus en suspension dans des bassins d'aération. Les micro-organismes des biofilms vont interagir avec les polluants, les utiliser comme substrats métaboliques et ainsi épurer les eaux. Des **bioréacteurs** sont aussi utilisés pour l'épuration des eaux. Dans ces réacteurs, les micro-organismes se fixent à des

supports mis à leur disposition et forment des biofilms. L'épuration des eaux se fait suivant le même mécanisme que dans les boues activées. Le bioréacteur est beaucoup moins encombrant que les dispositifs de boues activées (Wanner, 2006).

L'écotoxicologie fait souvent appel aux micro-organismes pour la **détermination du degré de pollution des eaux** ou le risque représenté par les substances toxiques. Les biofilms interagissent avec les toxiques ; ils peuvent fixer et accumuler les polluants éventuels sur des longues périodes. Les biofilms sont alors de **véritables marqueurs du degré de pollution chronique** de leur habitat (Wanner, 2006).

Les biofilms peuvent aussi servir **d'indicateurs de stress métallique**. De fortes précipitations peuvent amplifier l'écoulement au sein d'un cours d'eau et provoquer des remaniements au niveau des sédiments, qui vont relarguer des métaux dans l'eau. Les biofilms fluviaux réagissent très rapidement à ces nouvelles conditions environnementales ; peu de temps après les précipitations, la concentration en métaux à l'intérieur des biofilms augmente de façon significative. Le stress métallique se manifeste par la formation de polypeptides (phytochélatines) neutralisant les métaux en se liant à ces derniers dans des biofilms composés d'algues (Wanner, 2006).

Les biofilms présentent donc de grands avantages, notamment en matière d'épuration des eaux. Mais ces derniers peuvent aussi être délétères, y compris dans les installations industrielles.

## 6.3.2. Effets néfastes de la présence de biofilms

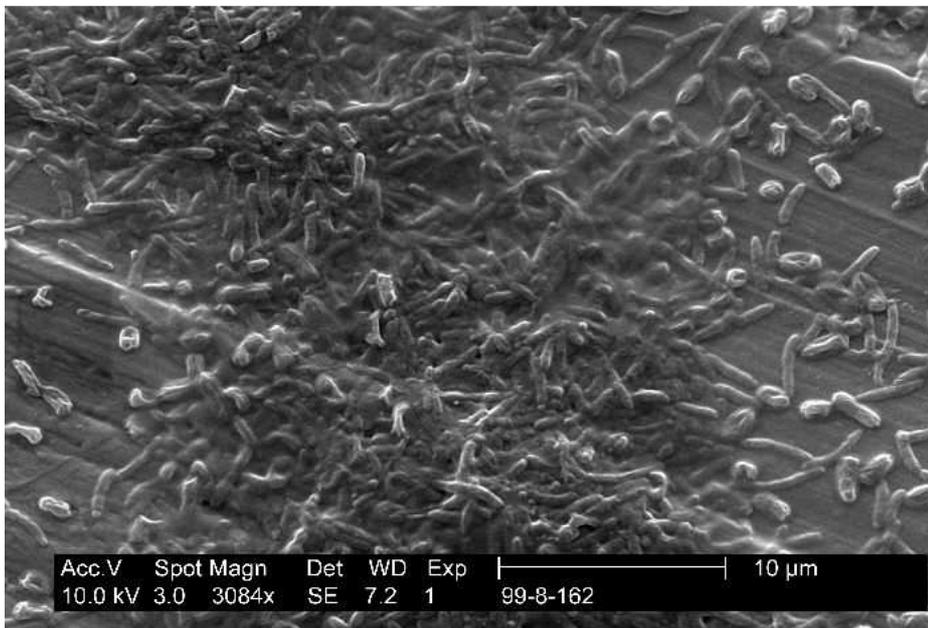
### 6.3.2.1. Biofilms et santé publique

Des biofilms peuvent se développer dans les **réseaux d'alimentation en eau potable** (Photographie 4) et dans les **systèmes de climatisation** ; ils peuvent abriter des légionelles et représentent donc un risque pour la santé humaine (Wanner, 2006).

**Photographie 4: Biofilms formés dans des canalisations d'eau potables, reproduits en laboratoire. Image obtenue par microscopie confocale.**

Photographie de Janice Car, Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Image Library, Atlanta, GA USA. Avec accord.

Sur la photographie, on observe des bactéries en forme de filaments, et regroupées en amas. Il s'agit de biofilms formés dans des canalisations d'eau potables.



Comme nous l'avons déjà vu, des biofilms peuvent se former sur les **implants médicaux**, comme les cathéters veineux centraux ou encore les sondes urinaires, et être à l'origine d'**infections nosocomiales** souvent difficiles à éradiquer et représentant un problème majeur de santé publique. Enfin, les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'**industrie agro-alimentaire**, en termes d'hygiène alimentaire et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires.

#### **6.3.2.2. Biofilms, dégradations et impact économique**

Les biofilms sont à l'origine d'un certain nombre de **dégradations** (bâtiments, corrosion et perforation de la coque des bateaux, altération de machines...) et ont par conséquent un **impact économique** important. Les **façades de nombreux bâtiments** sont attaquées par des algues et des champignons organisés en biofilms et entraînent d'importantes dégradations. Les réparations nécessaires représentent un coût important. Des biofilms se forment sur la **surface de la coque des bateaux**, créant une résistance à l'avancement du navire, ce qui entraîne donc une **augmentation de la consommation de carburant**. Les matériaux métalliques peuvent subir des réactions de **corrosion**, dues à l'activité de bactéries sulfo-réductrices organisées en biofilms, aboutissant à des **perforations**. Les biofilms qui se développent sur les échangeurs de chaleur installés dans les égouts, afin de récupérer la chaleur des eaux usées, altèrent fortement l'efficacité de ces appareils (Wanner, 2006).

#### **6.3.2.3. Moyens de lutte**

Les biofilms peuvent être en grande partie éliminés grâce à l'augmentation de la vitesse d'écoulement des effluents qui permet d'amplifier le cisaillement et donc de détacher le biofilm. Le **nettoyage mécanique** reste donc l'un des moyens les plus efficaces pour lutter contre les biofilms indésirables (Wanner, 2006).

Par les dommages qu'ils causent dans les milieux médical et industriel, les biofilms ont un **impact économique important**. Il est nécessaire de développer des moyens de lutte efficaces et pérennes contre la formation de biofilms. De manière croissante ces dix dernières années, les recherches concernant les moyens de lutte contre les biofilms se multiplient.

## **7. MOYENS DE LUTTE CONTRE LES BIOFILMS**

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

### **7.1. Empêcher la formation de biofilms**

Il existe plusieurs moyens de lutter contre la formation de biofilms indésirables. On prendra l'exemple du milieu hospitalier, dans lequel les biofilms, à l'origine d'infections nosocomiales, posent de sérieux problèmes de santé publique.

#### **7.1.1. Techniques couramment utilisées**

Le meilleur moyen d'empêcher la formation de biofilms sur des implants en milieu hospitalier repose sur le respect de quelques principes fondamentaux. La formation de biofilms sur des implants médicaux est liée à la **durée de présence de l'implant** dans l'organisme. Plus l'implant est là depuis longtemps, et plus il y a un risque de formation de biofilms. La pose de l'implant doit se faire dans des **conditions d'hygiène strictes**, afin d'éviter au maximum toute contamination bactérienne. Prenons l'exemple de la formation de biofilms bactériens sur des cathéters veineux centraux. Il existe plusieurs moyens de **contrôler la formation de biofilms** sur les cathéters veineux centraux (Maki, 1994) :

- préparation aseptique du site,
- pose aseptique du cathéter,
- durée de cathérisation minimale,
- utilisation topique d'antibiotiques,
- création d'une barrière mécanique en fixant le cathéter sur un implant fixé chirurgicalement,
- recouvrement des parois de la lumière du cathéter par un agent antimicrobien,
- retrait des implants contaminés.

Compte-tenu de l'importance médicale considérable des biofilms et des problèmes qu'ils posent, de nombreuses pistes de recherche sont consacrées à la lutte contre la formation des biofilms. Ce sont souvent les nouvelles technologies qui sont utilisées.

### 7.1.2. Les nouvelles technologies au service de la lutte contre les biofilms

Il existe des **revêtements** destinés aux biomatériaux implantables, comme les sondes urinaires ou les cathéters veineux centraux, qui empêchent l'adhérence des micro-organismes. Des **molécules chargées** retardent la fixation de ces derniers par le jeu de **forces de répulsion**. Les antibiotiques ou le système immunitaire auraient alors le temps d'agir contre les micro-organismes non fixés (Donlan, 2008). Cette technique de lutte contre les biofilms reste néanmoins **peu efficace** car la matrice extracellulaire qui se forme autour des prothèses peut elle-même être initiatrice de la formation de biofilms (Bury-Moné, 2007).

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

On peut aussi essayer d'agir au niveau des molécules de signalisation du quorum sensing, afin de **perturber l'architecture du biofilm** et ses **propriétés d'antibiorésistance** (Donlan, 2008 ; Tomlin, 2005). Cette méthode semble très prometteuse. Elle est, entre autre, utilisée en aquaculture et dans les revêtements des bateaux. Des études sur les mécanismes d'inhibition de la formation de biofilms ont été réalisées sur une algue rouge, *Delisea pulchra*, car elle ne porte aucun biofilm à sa surface. Elle sécrète des **furanones**, qui sont des homologues des homosérinelactones, substances exerçant un **contrôle inhibiteur sur la communication bactérienne** (Bury-Moné, 2007).

On peut lutter contre la formation de biofilms en inhibant la synthèse des exopolysaccharides de la matrice. Certaines souches de phages d'*Enterobacter agglomerans* produisent une enzyme capable de détruire la matrice extracellulaire puis d'infecter et de lyser les bactéries du biofilm (Bury-Moné, 2007).

L'utilisation d'ultrasons combinée à celle des antibiotiques permet d'éliminer des bactéries Gram-négative planctoniques ou sous forme de biofilms (Donlan, 2008) (cf page 85).

Enfin, les recherches en génie génétique consistent à rechercher des **gènes spécifiquement exprimés au sein des biofilms** afin de créer de nouvelles cibles (Donlan, 2008).

## **7.2. Eliminer des biofilms déjà formés**

Lorsqu'on n'a pas pu agir suffisamment tôt pour empêcher la formation de biofilms, le meilleur moyen de lutter contre ces derniers est de les **détruire**. De nombreuses techniques se font concurrence. Comme on a pu l'évoquer précédemment, l'antibiothérapie donne peu de résultats satisfaisants. D'où l'intérêt de développer d'autres méthodes de lutte contre les biofilms. On traitera surtout des techniques d'éradication employées dans le milieu hospitalier, compte-tenu des importants problèmes de santé publique liés à la présence de biofilms.

### **7.2.1. Techniques d'élimination des biofilms couramment utilisées**

#### **7.2.1.1. Elimination mécanique du biofilm**

Le **nettoyage mécanique** reste l'un des moyens les plus efficaces pour lutter contre les biofilms (Wanner, 2006). Il permet de les éliminer en détachant les micro-organismes de leur support, grâce aux forces de cisaillement importantes créées. Ceci est applicable pour les biofilms présents sur des supports variés : bâtiments, coques de bateaux, peau, implants médicaux... En médecine équine, le premier traitement à mettre en place en cas de plaie cutanée importante est d'arroser la plaie au jet d'eau sous pression pendant au moins trente minutes afin de nettoyer cette dernière. Un autre exemple concret de l'efficacité du nettoyage mécanique pour éliminer des biofilms est l'utilisation de shampoings vétérinaires. Il est plus efficace de masser le chien pendant 10 minutes avec le shampoing que de le laisser poser pendant cette même durée (Smith, 2001). Lors de l'application du shampoing, des réactions de saponification ont lieu. Ces dernières vont entraîner la solubilisation de la matrice du biofilm présent sur la couche cornée. Le massage complète l'action du shampoing et va permettre l'exfoliation cutanée et l'élimination des cornéocytes sur lesquels s'était formé le biofilm.

Le nettoyage précède la **désinfection**. Le but de cette dernière est de **détruire les bactéries du biofilm**, qui n'auraient pas été éliminées préalablement par le nettoyage. Toutes les molécules n'ont pas la même efficacité. L'usage de chlorexidine comme antiseptique n'est pas efficace pour réduire le nombre d'infections dues à des bactéries Gram-négatives et sélectionne des individus résistants à de nombreux agents anti-microbiens. L'utilisation de triclosan peut se révéler efficace (Stickler, 2002). La plupart des antiseptiques et désinfectants

ont du mal à pénétrer au sein des biofilms, et les bactéries des biofilms sont résistantes à leur action. Cette méthode se révèle **peu efficace**.

Face à la fréquente inefficacité de l'antibiothérapie et de l'emploi d'antiseptiques et de désinfectants, le seul traitement efficace est le retrait du substrat contaminé, qu'il s'agisse d'un implant médical, de tissus infectés ou de croûtes (Anderson, 2008 ; Brady, 2008). Ce principe est directement applicable en dermatologie : par exemple, le **retrait d'un « corps étranger endogène »** entraîne la guérison des lésions cutanées. D'un point de vue histologique, un corps étranger endogène se caractérise par la présence dans le derme d'un élément habituellement confiné dans l'épiderme (comme la kératine du poil par exemple) et de ce fait jamais au contact du système immunitaire. Ce corps étranger endogène va donc déclencher une réaction immunitaire semblable à celle observée lors de la présence de corps étranger. Les réactions inflammatoires rencontrées lors de furonculoses ou de poils incarnés s'expliquent par la présence inhabituelle de kératine (poil) dans le derme. Le retrait de la kératine entraîne la guérison du patient. De ce fait, on pourrait penser que la kératine du poil est un substrat idéal pour la fixation de bactéries et la formation de biofilms. On peut étendre le principe de corps étranger endogène au bouchon de cérumen pénétrant dans le derme lors d'acné, et servant de support à la formation de biofilms.

#### **7.2.1.2. Antibiothérapie**

Les biofilms sont caractérisés par des propriétés d'antibiorésistance élevée. De nombreuses recherches sont donc actuellement en cours afin de trouver le moyen de contrer cette antibiorésistance développée par les biofilms. Une hypothèse étant que l'on n'administre pas les antibiotiques à une dose suffisante pour éliminer le biofilm, certains chercheurs cherchent à déterminer les concentrations d'antibiotiques qu'il faudrait pour éradiquer un biofilm.

La **sensibilité aux antibiotiques n'est pas la même pour une bactérie donnée, selon son mode de vie**, planctonique ou en biofilm. La sensibilité d'une bactérie à un antibiotique est mesurée selon des techniques standardisées définies par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). La **sensibilité** des bactéries planctoniques **relarguées par le biofilm**, est évaluée par la Concentration Minimale Inhibitrice du Biofilm ou **CMIB**<sup>21</sup>, de la même manière que la sensibilité aux antibiotiques de bactéries

---

<sup>21</sup> En anglais: BMIC pour Biofilm Minimal Inhibitory Concentration

planctoniques est évaluée par la Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI. La sensibilité aux antibiotiques des **bactéries du biofilm** est évaluée par la Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm ou **CMEB**<sup>22</sup>. **La valeur de la CMEB renseigne sur la sensibilité des bactéries du biofilm à un antibiotique donné** (Conley, 2003). Le but des recherches est de trouver des moyens pour lutter contre l'antibiorésistance des biofilms en déterminant leur CMEB.

Compte-tenu de la pharmacodynamie de l'antibiotique et des profils d'antibiorésistance différents selon le type de biofilms rencontrés, l'efficacité d'un traitement n'est donc jamais véritablement prévisible. L'antibiothérapie est **souvent inefficace** et se solde la plupart du temps par un échec. Mais parfois, il n'y a pas d'autre solution envisageable...

Une **antibiothérapie à long terme** peut être efficace chez des patients atteints d'infections associées à la présence d'une prothèse intravasculaire (Utili, 2007). Ce traitement ne présente **en aucun cas une alternative au traitement chirurgical** (retrait de la prothèse) si ce dernier est possible ; mais c'est la meilleure solution pour les patients ne pouvant subir à nouveau une intervention chirurgicale (sénilité, maladies intercurrentes, risques per opératoires et post-opératoires, ou refus de la part du patient de subir l'intervention). Les agents antimicrobiens doivent être administrés par voie intraveineuse à la dose maximale tolérée par le patient, pendant une durée minimum initiale de 4 à 6 semaines. Lorsque la phase aiguë de l'infection est jugulée, on continue l'antibiothérapie par voie orale. On ne connaît pas la durée totale conseillée du traitement (Utili, 2007).

L'utilisation de **nouveaux agents antibactériens** permettrait de lutter contre l'infection chez les patients inopérables pendant une longue durée et de l'éradiquer. Ces nouveaux agents antibactériens et antifongiques ont une activité bactéricide rapide, et/ou un large spectre. On peut citer : la **daptomycine**, la **caspofungine** (activité bactéricide rapide) ou encore la **tigecycline** (large spectre). Cependant, les données concernant l'efficacité et l'innocuité de ces médicaments sont loin d'être complètes (Utili, 2007).

---

<sup>22</sup> En anglais: MBEC pour Minimal Biofilm Eradication Concentration

## **7.2.2. Les nouvelles technologies au service de la lutte contre les biofilms**

### **Utilisation de bactériophages.**

Des bactériophages peuvent être instillés localement au niveau des cathéters afin d'éradiquer les biofilms présents (Donlan, 2008). L'activité de phages T4 réduit de façon notable les biofilms d'*Escherichia coli* dans des modélisations *in vitro* (Doolittle, 1995). On n'observe **pas de diminution de la sensibilité aux phages avec l'âge du biofilm** (Donlan, 2008).

### **Élimination ciblée d'une espèce microbienne au sein du biofilm.**

Cette méthode d'éradication des biofilms consiste à **déstabiliser l'écosystème du biofilm** en désorganisant totalement sa structure intime, par l'élimination ciblée d'une espèce bactérienne, que l'on aura choisi au préalable (Bury-Moné, 2007).

### **Ultrasons et potentialisation de l'action des antibiotiques.**

Il existe une **synergie entre antibiotiques** (comme par exemple la gentamicine) **et ultrasons** qui permet par exemple d'éliminer des bactéries Gram-négatives planctoniques ou sous forme de biofilms. On parle d'**effet bio-acoustique** ou d'**effet bio-électrique**. Le mécanisme de cette synergie est mal connu, on peut penser qu'il résulte d'une perturbation de l'organisation membranaire de bactéries permettant ainsi une meilleure diffusion de l'antibiotique au sein du biofilm (Donlan, 2008).

L'**action synergique des ultrasons et de la gentamicine** dans la réduction de biofilms d'*Escherichia coli* a été mise en évidence sur des modèles animaux (Carmen, 2005). Les résultats de l'étude montrent de façon très significative que l'association d'ultrasons et de gentamicine est plus efficace que l'administration de gentamicine seule dans le traitement contre les biofilms.

### **Utilisation d'enzymes dégradant les exopolysaccharides de la matrice.**

L'utilisation d'enzymes dégradant des polysaccharides de la matrice et désorganisant totalement l'architecture du biofilm, pour enfin aboutir à sa destruction, peut fournir des pistes de recherche pour l'éradication des biofilms (Donlan, 2008). Prenons l'exemple des biofilms

de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces derniers produisent un exopolysaccharide, l'alginate, aux propriétés intéressantes : il retarde la diffusion des aminosides au sein du biofilm et inhibe leur activité anti-microbienne. Si on ajoute au milieu une enzyme dégradant l'alginate, l'alginate lyase, on augmente le pouvoir de pénétration et l'activité anti-microbienne de l'antibiotique (gentamicine, tobramicine) dans le biofilm (Donlan, 2008).

### **Recherche de nouvelles thérapies anti-microbiennes.**

Le challenge est de développer de nouveaux traitements et de nouveaux moyens lutte contre la tolérance des bactéries aux antibiotiques (Lewis, 2008).

La **thérapie combinée** consiste à utiliser différents composés afin de potentialiser leurs effets. Certains composés comme les macrolides peuvent détruire la matrice d'exopolysaccharides du biofilm et favoriser la diffusion d'autres agents anti-microbiens associés au sein du biofilm (Donlan, 2008). L'utilisation d'**antibiotiques sous forme retard**, ingérés sous forme inactive puis activés au sein de la cellule bactérienne, est une stratégie en cours d'étude (Lewis, 2008). L'idéal pour limiter la formation de biofilm serait d'utiliser du matériel médical et des implants médicaux avec une **surface stérile** ou **recouverte d'agents anti-microbiens** (Lewis, 2008).

Les biofilms de bactéries Gram-positives et Gram-négatives peuvent être éradiqués lorsqu'ils sont exposés pendant une **longue durée** à de **fortes concentrations d'agents anti-microbiens**. C'est le principe de la thérapie anti-microbienne de verrouillage.

Le principe de la thérapie anti-microbienne de verrouillage (ALT pour Anti-microbial Lock Technique) est **d'instiller in situ** le cathéter colonisé par les micro-organismes avec de **très fortes doses d'agents anti-microbiens** pendant une **durée suffisante**, afin d'**éradiquer le biofilm**, c'est-à-dire d'enlever toutes les cellules microbiennes fixées à la surface (Donlan, 2008). Le volume d'agent anti-microbien doit remplir la lumière du cathéter mais ne doit pas se disperser dans la circulation sanguine générale (Donlan, 2008).

L'utilisation d'une antibiothérapie systémique en plus de l'ALT n'a aucun effet sur l'ALT. En revanche, la combinaison de différents agents anti-microbiens pour la technique d'ALT se révèle plus efficace (Messing, 1988). On rejoint ici le principe de la thérapie combinée, exposée précédemment. Les agents utilisés sont actifs contre le type de bactéries que l'on cherche à détruire. Les agents efficaces contre les bactéries Gram-positives sont : la nafcilline (résistant aux  $\beta$ -lactamases), la rifampine, la ciprofloxacine, la vancomycine, la

teicoplanine, le linezolid... (Donlan, 2008). Les agents efficaces contre les bactéries Gram-négatives sont la plupart des antibiotiques de la famille des aminosides, dont la gentamicine (Donlan, 2008).

La **sensibilité d'un biofilm** à des agents anti-microbiens est fortement **influencée par l'âge du biofilm**. La **sensibilité à certains antibiotiques** (cephalothine, clindamycine, érythromycine, vancomycine et teicoplanine) **diminue** de façon significative **avec l'âge du biofilm** (Monzon, 2002). Par contre, l'activité de certains antibiotiques comme la rifampine ou la tétracycline est très peu ou pas affectée. Les quantités croissantes d'exopolysaccharides produites par le biofilm vieillissant créent des gradients de nutriments et d'oxygène : la conséquence principale est le ralentissement de la croissance des cellules et de leur métabolisme, les rendant moins sensibles à l'attaque des agents anti-microbiens.

La plupart des études réalisées sur l'efficacité de la thérapie anti-microbienne de verrouillage sur les infections systémiques liées à la présence d'un cathéter montre que l'infection peut être jugulée au bout de 14 jours de traitement. Mais les études de cas ne fournissent pas d'éléments suffisants pour affirmer que l'ALT permet d'éradiquer les biofilms responsables (Donlan, 2008).

L'utilisation d'agents anti-microbiens à fortes concentrations peut être toxique pour le patient si la dose est administrée accidentellement dans le flux sanguin systémique. Les principaux risques de l'ALT, surtout dans les structures médicalisées et les hôpitaux, sont le développement de souches résistantes et la sélection de mutants résistants.

D'autres molécules peuvent être administrées au patient, suivant le même principe que l'ALT. On peut citer l'EDTA (acide éthylène diamine tétra- acétique) qui a des propriétés antibactériennes et antifongiques. L'EDTA est capable de déstabiliser la structure d'un biofilm (Donlan, 2008).

## **8. PROPOSITION DE VOIES DE RECHERCHE SUR LA PROBLEMATIQUE DES BIOFILMS EN DERMATOLOGIE**

Les biofilms présents à la surface de la peau de l'Homme et de l'animal jouent un **rôle important** dans de nombreux phénomènes : cicatrisation, homéostasie, apparition et perpétuation de diverses dermatoses...

**Très peu d'études** ont été réalisées à ce sujet. Ne disposant donc que de peu de données, nous nous proposons principalement dans ce travail d'identifier certains axes de recherche possibles, visant à identifier les caractéristiques des biofilms cutanés. A terme, les applications envisageables incluent la prescription raisonnée et cohérente de topiques, la modification des biofilms présents afin que leurs caractéristiques redeviennent favorables à l'écosystème cutané.

Dans un premier temps, nous verrons dans quelle mesure la peau joue le rôle d'une véritable interface entre l'organisme et le milieu extérieur, par sa structure originale et par les fonctions qu'elle remplit. Puis nous traiterons de la problématique des biofilms présents à la surface de la peau et de leur implication dans certaines dermatoses. Enfin, nous proposerons des suggestions applicables lors d'une démarche de prescription raisonnée de topiques dermatologiques dans le cadre du traitement de dermatoses humaines et animales.

### **8.1. La peau, interface entre l'organisme et le milieu extérieur**

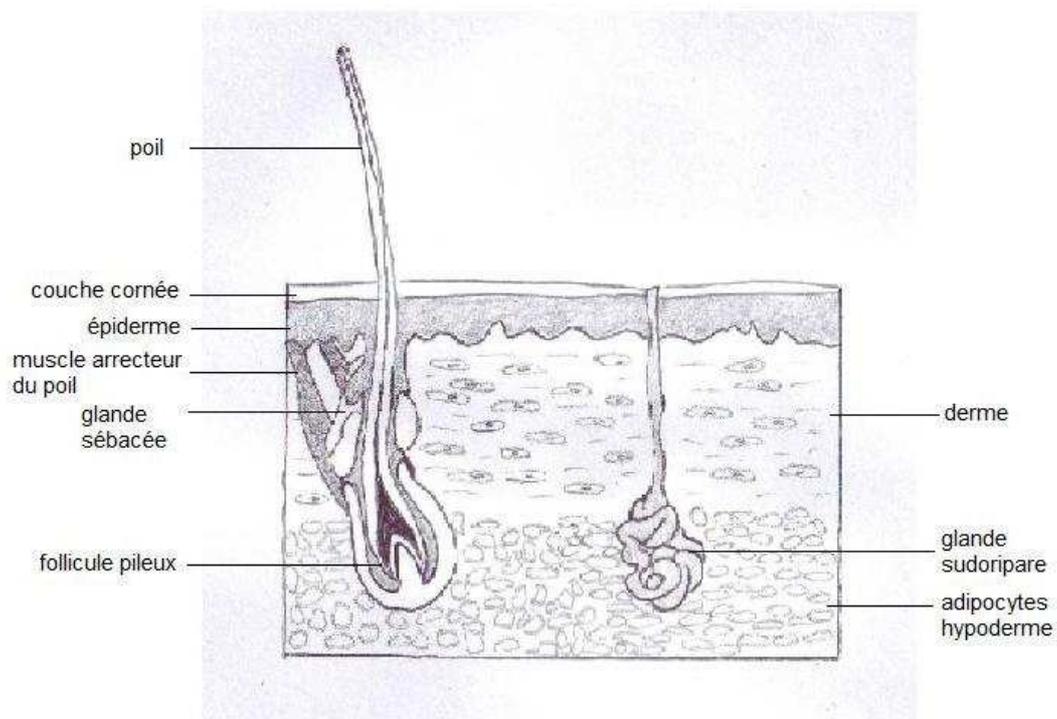
La peau est à l'**interface** entre le milieu intérieur et l'environnement. Elle représente chez l'Homme et l'animal l'organe le plus important en poids (12% du poids d'un animal adulte) mais aussi, après la surface totale des alvéoles pulmonaires, l'organe le plus étalé en contact avec le milieu extérieur (Scott, 2001). Elle représente la surface d'un court de tennis. Il s'agit à la fois d'un **organe de protection** mécanique, biologique et physique vis-à-vis des agressions extérieures, mais également d'un **organe récepteur et producteur** de divers métabolites. La sueur et le sébum produits par la peau, ainsi que la desquamation, protègent l'organisme de l'invasion de micro-organismes en régulant l'écosystème cutané. Finalement, la peau est un véritable **organe d'échanges et de communication**. Nous allons tout d'abord présenter de façon détaillée l'organisation structurale de la peau.

### 8.1.1. Structure de la peau

La peau est une structure hétérogène, composée de trois couches superposées : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 9).

**Figure 9 : Structure générale de la peau chez l'Homme.**

D'après (Martini, 2006)



Chez le chien, la peau est plus épaisse sur le chanfrein, la partie supérieure du cou, le dos, la croupe et la base de la queue. La peau est particulièrement fine sur le scrotum, les oreilles, au niveau des creux axillaire et inguinaux ainsi qu'en périphérie de l'anus. L'épaisseur moyenne de la peau chez le chien oscille entre 0,5 et 5 mm (Mialot, 1993).

### 8.1.1.1. L'épiderme

L'épiderme constitue la **partie la plus superficielle** de la peau, et a une épaisseur moyenne de 100 µm chez l'Homme. Il est constitué de trois populations cellulaires principales : les **kératinocytes**, les **mélanocytes** et les **cellules de Langerhans** (cellules présentatrices d'antigènes, responsables de l'immunité cutanée).

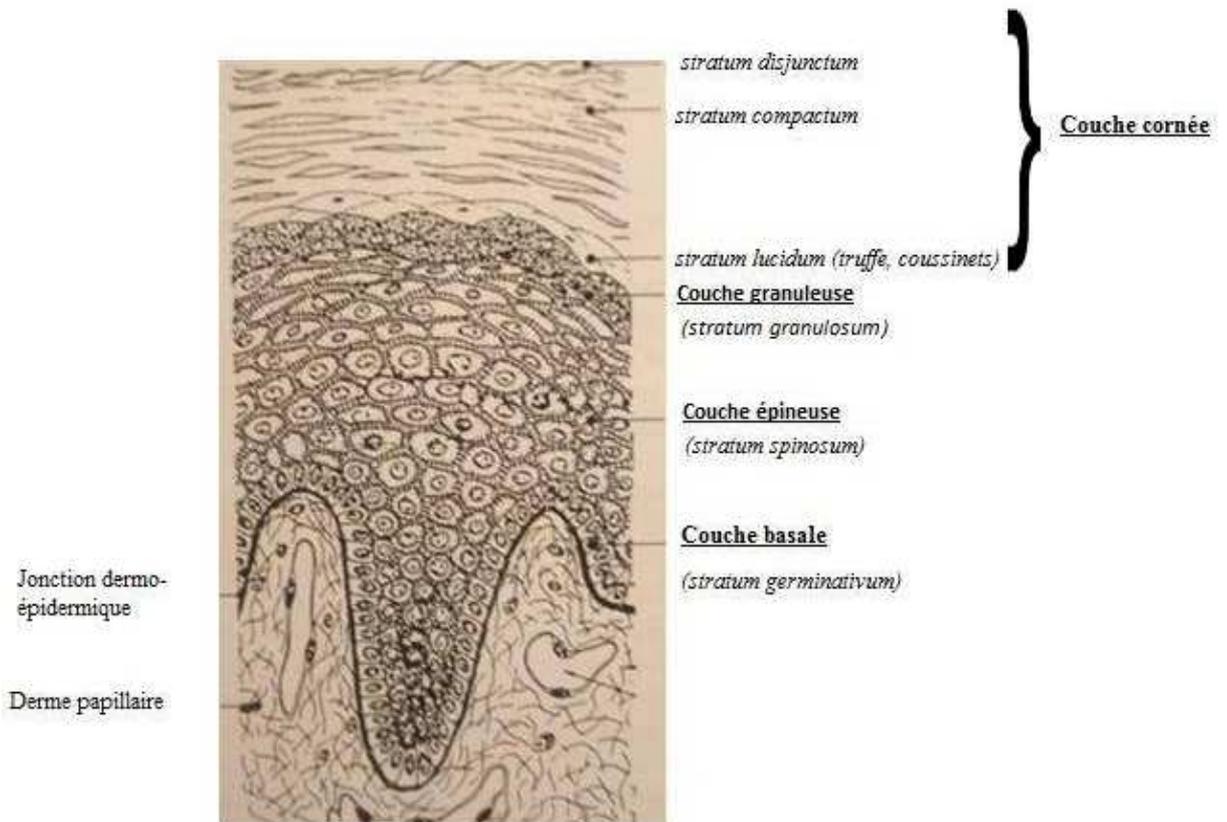
L'épiderme est très mince chez le chien : 0,1 à 0,5 mm d'épaisseur (Llyod, 1982). Son épaisseur reste sensiblement identique d'un territoire cutané à un autre, sauf dans des zones très spécialisées comme la truffe ou les coussinets, où il est particulièrement épais, jusqu'à 1,5 mm (Scott, 2001).

#### 8.1.1.1.1. Organisation structurale de l'épiderme

L'épiderme est constitué à 95% de kératinocytes, disposés en différentes couches superposées. Ces kératinocytes sont produits en permanence à partir de la couche basale et migrent verticalement de la couche basale vers la couche cornée. Cette **migration kératinocytaire** est accompagnée d'une **différenciation cellulaire** : l'association simultanée de ces deux phénomènes est appelée **kératinisation**. On identifie quatre couches cellulaires superposées (Figure 10).

## Figure 10 : Organisation structurale de l'épiderme

D'après (Martini, 2006)



- La **couche basale** ou couche germinative : *stratum germinativum*

La couche basale est constituée par une assise simple de cellules dont 10% sont des cellules souches, 50% sont en mitose et 40% sont en voie de différenciation kératinocytaire et migreront dans la couche supérieure. C'est donc le lieu du **renouvellement** des kératinocytes.

- La **couche épineuse** : *stratum spinosum*

La couche épineuse est constituée de plusieurs assises de kératinocytes. Reliées entre elles par des **desmosomes** en nombre important, la déshydratation qui est effectuée lors de la fixation en vue de l'examen histologique provoque une rétraction cellulaire qui épargne les

sites de jonction interkératinocytaire. L'aspect étoilé qui en résulte a donné le nom de couche « épineuse ». On trouve des granules lamellaires contenant des lipides (céramides, cholestérol, acides gras) et des enzymes (protéases, lipases, glycosidases..) dans le cytoplasme des kératinocytes.

Chez le chien, la couche granuleuse est d'épaisseur variable selon les régions. De une à deux couches cellulaires dans les zones pileuses, elle peut être constituée de plus de 20 couches au niveau de la truffe, des coussinets plantaires et des jonctions cutanéomuqueuses (Olivry, 1993).

➤ La **couche granuleuse** : *stratum granulosum*

La couche granuleuse est constituée de plusieurs assises cellulaires, qui sont le siège d'une kératinisation abondante. On trouve au sein des cellules de cette couche des organites particuliers notamment des **grains de kératohyaline** (contenant de la profilaggrine) et des corps d'**Odland** (organites lipidiques libérant les lipides du ciment intercellulaire du *stratum corneum* lors du stade terminal de kératinisation).

Chez le chien, la couche granuleuse est plus développée au niveau des coussinets plantaires (quinze assises de cellules) et de la truffe (trois à quatre assises cellulaires). En revanche, on n'observe en général pas de couche granuleuse dans les régions mandibulaire, maxillaire, temporale, crâniale ou en face externe des pavillons auriculaires (Mialot, 1993).

➤ La **couche cornée** : *stratum corneum*

Il s'agit de la couche la plus superficielle de l'épiderme. Son épaisseur totale est de 10 µm chez l'Homme. Chez le chien, son épaisseur est comprise entre 5 et 1500 µm (Scott, 2001). La couche cornée est plus fine dans les territoires cutanés glabres ou faiblement pileux ; elle est plus épaisse au niveau de la truffe et des coussinets plantaires (Tizon, 2006).

La couche cornée est constituée de trois couches différentes, de la plus profonde à la plus superficielle :

- *Stratum lucidum* : couche présente uniquement au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds chez l'Homme, et au niveau de la truffe et des coussinets chez le chien,

- *Stratum compactum* : couche cornée à proprement parler,
- *Stratum disjonctum* : couche la plus externe, qui se désquame.

Les kératinocytes retrouvés dans la couche cornée ont achevé leur processus de kératinisation et atteint le stade ultime de différenciation cellulaire : ils sont devenus des **cornéocytes**. Il s'agit de cellules mortes, aplaties, anuclées et composées presque exclusivement de kératine. On trouve dans leur cytoplasme de nombreuses enzymes intervenant dans des phénomènes de métabolisation, et des substances permettant la fixation de l'eau et donc le maintien de l'hydratation cutanée. Ces cornéocytes sont reliés entre eux par des **cornéodesmosomes**.

L'agencement des cornéocytes au sein du *stratum corneum* est très schématique : on peut en effet le comparer à un mur de briques (Figure 12) (Baumann, 2002 a ; Martini, 2006). Les cornéocytes représentent les briques. Le « ciment » qui les unit est constitué en partie par des **lipides**, notamment des acides gras poly-insaturés (25%), du cholestérol (20%) et des céramides (plus de 40%), d'après (Baumann, 2002 b). Ces lipides proviennent soit des granules lamellaires des kératinocytes soit des glandes sébacées. La plupart de ces lipides sont amphiphiles. On trouve aussi dans le liant unissant les cornéocytes du *stratum corneum* des acides aminés et des métabolites, issus de la dégradation de la filaggrine, qui forment le **Facteur Naturel d'Hydratation (FNH)**<sup>23</sup>. Cette association « en mur de briques » empêche la pénétration de substances exogènes et limite les pertes en eau : on parle d' « effet barrière » du *stratum corneum*. La comparaison s'arrête là puisque la cohésion n'est pas liée à cette organisation mais à la présence de nombreux cornéodesmosomes.

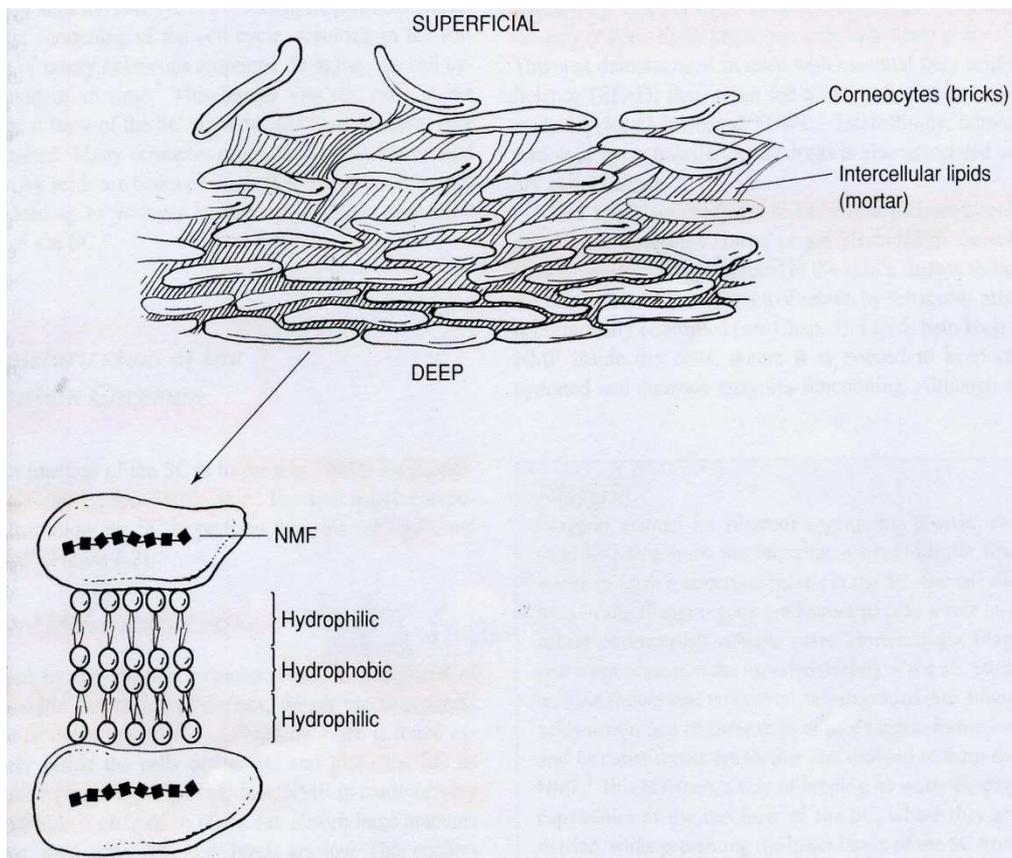
---

<sup>23</sup> En anglais : NMF pour Natural Moisturizing Factor.

**Figure 11: Organisation structurale du *stratum corneum* : le modèle « mur de briques »**

D'après (Baumann L, 2002 a)

Dans la structure en « murs de brique » de l'épiderme, les cornéocytes représentent les briques. Les lipides (céramides, cholestérol et acides gras poly-insaturés) et le Facteur Naturel d'Hydratation (NMF pour Natural Moisturizing Factor) représentent le ciment intercellulaire et assure, avec les cornéodesmosomes, la cohésion entre les cornéocytes.



Les cornéocytes superficiels se détachent régulièrement de la surface cutanée au cours du processus physiologique de **désquamation**, phase ultime du **renouvellement permanent de l'épiderme** ou « **turn-over épidermique** ». Sa durée moyenne est de 26 à 42 jours chez l'Homme, soit environ un mois (Arnold, 1990). Le temps de renouvellement cellulaire de l'épiderme chez le chien est de 22 jours en moyenne. Il est peut être de 15 jours si le chien a été tondu (Baker, 1973).

#### 8.1.1.1.2. Importance du *stratum corneum* : l'« effet barrière »

Le *stratum corneum* est à l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur. Il joue un rôle important vis-à-vis des agressions extérieures et est responsable du maintien de l'hydratation de la peau : on parle d' « **effet barrière** » (Hafttek, 2001) :

- **Imperméabilité relative à l'eau**, par la contention des liquides physiologiques et l'inhibition de la pénétration transcutanée de substances hydrophiles,
- **Résistance à l'invasion de bactéries pathogènes**, grâce à l'acidité cutanée régulée par les sécrétions sébacées et les produits de dégradation de la filaggrine chez l'Homme et, dans une moindre mesure chez le chien (cf page 96),
- **Résistance aux agressions physiques et chimiques**,
- **Filtration efficace des rayons ultra-violets**,
- **Maintien du pH cutané**.

L'effet barrière nécessite l'intégrité du *stratum corneum* pour se manifester. Ce sont le FNH et le film hydro-lipidique de la couche cornée qui sont les acteurs principaux de cet effet barrière. Le FNH permet de fixer l'eau au sein de l'épiderme et préserver l'environnement aqueux adéquat pour le fonctionnement enzymatique. Les **lipides** du *stratum corneum* empêchent la perte d'eau transcutanée et l'invasion de la peau par des bactéries pathogènes. Une altération du ratio des lipides présents au niveau du *stratum corneum* et/ou une déficience en FNH entraînent une altération sévère de la fonction barrière, ayant pour conséquences des troubles cutanés graves (ichtyose par exemple, dans le cas de la dermatite atopique) (Humbert, 2003).

Le marqueur de l'altération de la fonction barrière de l'épiderme est l'**augmentation de la perte insensible en eau transcutanée**, appelée aussi **TEWL**<sup>24</sup> (Baumann, 2006 a ; Humbert, 2003).

---

<sup>24</sup> TEWL signifie TransEpidermal Water Loss.

#### 8.1.1.2. Le derme

Le derme a une épaisseur de 500 µm à 1 mm chez l'Homme et de 0,77 mm en moyenne chez le chien (Martini, 2006 ; Mialot, 1993). Il est composé de **fibroblastes**, qui synthétisent du **collagène**, de l'**élastine** et des **protéoglycanes**. Ces derniers ont un fort pouvoir de rétention d'eau, et constituent un véritable gel. On retrouve aussi dans le derme des cellules migratrices, des macrophages, des lymphocytes et des granulocytes éosinophiles.

Le derme est à l'origine des propriétés mécaniques de la peau et sert de **réservoir d'eau** par l'intermédiaire du gel de protéoglycanes (Martini, 2006).

#### 8.1.1.3. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche cutanée la plus profonde. Il n'y a pas de solution de continuité derme-hypoderme : on observe seulement un changement progressif dans la nature du tissu conjonctif. Il s'agit d'un **tissu conjonctif lâche**, contenant du collagène, un gel de protéoglycanes et surtout des **adipocytes** (Martini, 2006). Dans certains endroits du corps, la peau est immédiatement accolée au muscle ou au cartilage et l'hypoderme est peu épais voire virtuel.

### 8.1.2. Propriétés et caractéristiques physico-chimiques de la peau

Le pH physiologique de la peau est acide. L'acidité cutanée ne fournit pas un milieu propice à la colonisation bactérienne et fongique. Cependant, la peau saine est le siège d'une colonisation permanente de micro-organismes sous forme de biofilms : il s'agit de la flore cutanée résidente. Cette dernière a un rôle bénéfique et protecteur vis-à-vis des contaminations par des micro-organismes pathogènes.

#### 8.1.2.1. Le pH cutané

Alors que le pH du derme est voisin de 7, il devient acide au niveau du *stratum corneum*. Les valeurs du pH cutané se situent généralement entre 4 et 7, avec une valeur moyenne de **5.5** chez l'Homme. Le pH cutané de l'homme est plus acide que celui des autres mammifères (Matousek, 2002). Chez le chien, le pH cutané est légèrement plus alcalin que chez l'Homme : il varie entre 5.5 et 7.5 (Sers, 1984 ; Tizon, 2006 ; Matousek, 2002).

L'acidité cutanée provient des produits de la dégradation de la filaggrine, contenue dans les kératinocytes : acide urocanique, acide pyrrolidone carboxylique et acide lactique. L'**acidité cutanée** est une caractéristique primordiale d'une **peau saine** : elle empêche la colonisation par des micro-organismes pathogènes, ainsi que l'oxydation de la couche cornée. (Masako, 2005). Une altération de la couche cornée entraîne une élévation du pH: en effet, presque toutes les dermatoses sont accompagnées d'une alcalinisation de la peau (Matousek, 2002 ; Tizon, 2006 ; Martini, 2006).

Les valeurs du pH cutané varient en fonction des **individus**, de l'**âge**, du **sexe** et de la **région anatomique** concernée. Chez l'**Homme**, la peau est plus alcaline chez les femmes et chez les personnes âgées (Martini, 2006). Chez le chien, les régions du dos et du cou ont des pH avec des valeurs moyennes de 6 alors que le pH de la région auriculaire a une valeur moyenne de 5 (Tizon, 2006). Chez le **chien**, le pH cutané **varie** avec la **race**, l'**âge** et le **stress** (Matousek, 2002 ; Tizon, 2006). Par exemple, le Labrador a un pH cutané de 7,13 alors que le Schnauzer nain, le Springer spaniel et le Yorkshire terrier ont respectivement un pH cutané de 7,25, 6, 65 et 7,71 (Matousek, 2002). Les mâles ont un pH cutané plus élevé que les femelles ; et les femelles stérilisées ont un pH cutané plus élevé que les femelles non stérilisées (Matousek, 2002). Le pH cutané d'un même animal décroît avec le temps, à l'inverse de l'homme (Meyer, 1991). Enfin, le stress pourrait générer une augmentation du pH cutané d'environ une unité en moins d'une minute (Meyer, 1991 ; Matousek, 2002). Les valeurs relativement alcalines du pH cutané du chien peuvent expliquer le fait que l'on rencontre plus fréquemment des dermatoses chez le chien que chez les autres mammifères, et l'homme en particulier, puisque c'est en partie l'acidité cutanée qui protège de l'invasion de micro-organismes (Matousek, 2002).

Chez l'Homme, le pH cutané est **régulé par l'excrétion sudorale** de composés chimiques acides comme l'acide lactique, l'acide undécylénique et l'acide urocanique. La peau possède un **pouvoir tampon** efficace. Les sécrétions sébacées protègent la peau vis-à-vis des micro-organismes pathogènes grâce à leur acidité (Matousek, 2002 ; Martini, 2006).

Les biofilms bactériens se forment de façon optimale dans un milieu dont le pH est proche de la neutralité (Martinez, 2007). Or, l'acidité cutanée ne fournit pas un milieu propice à une prolifération bactérienne. Cependant, certaines bactéries peuvent former des biofilms dans des conditions de pH plus acides. En effet, on trouve de façon physiologique des communautés bactériennes à la surface de la peau : il s'agit de la flore commensale cutanée. L'alcalinisation de la peau fréquemment rencontrée lors de dermatoses favorise la

colonisation bactérienne, la formation de nouveaux biofilms et par conséquent le développement de surinfections bactériennes, ce qui aggrave la dermatose déjà existante (Matousek, 2002).

### **8.1.2.2. Le film hydrolipidique**

#### **8.1.2.2.1. Composition**

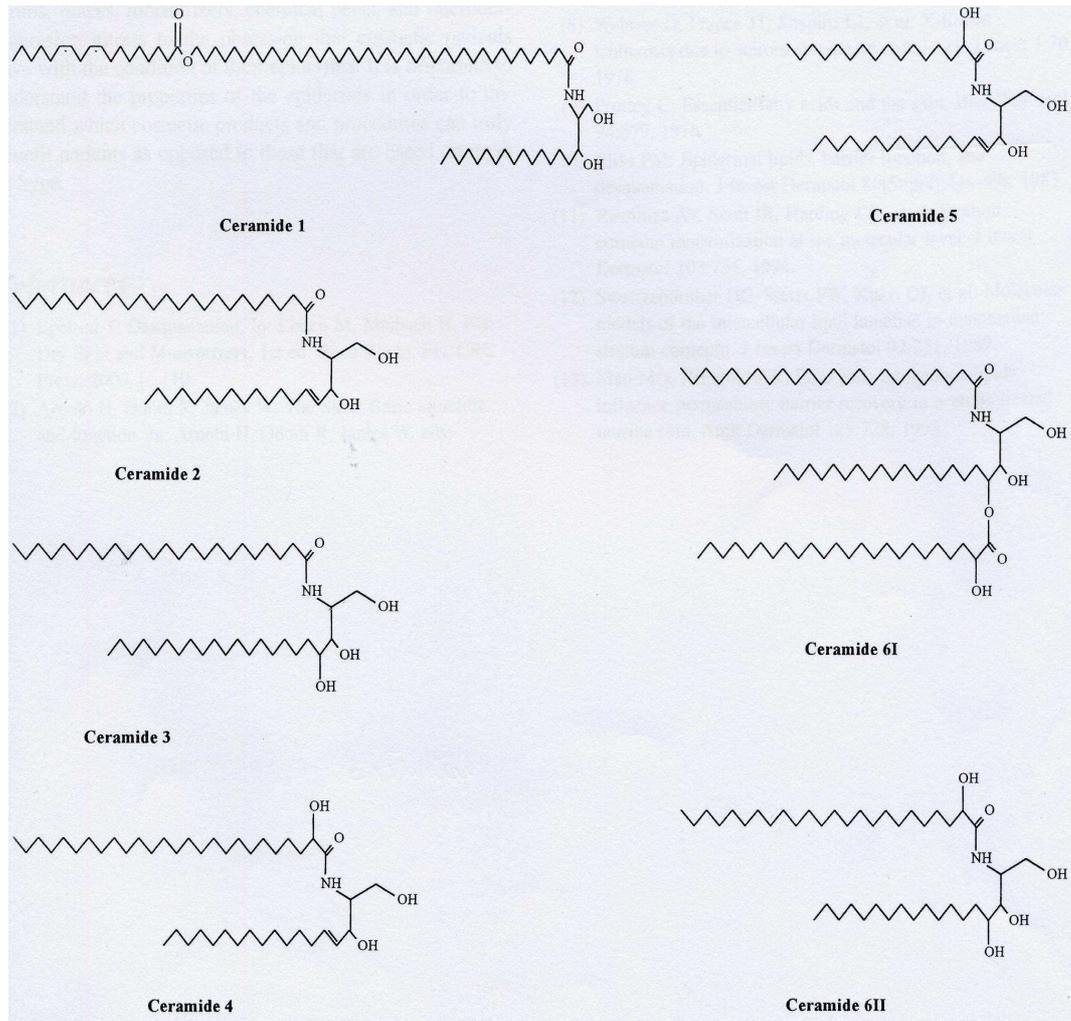
La surface cutanée est hydrophobe (Humbert, 2003). Elle est recouverte d'un film hydrolipidique, qui est le résultat d'une **émulsion sébum-sueur**. La phase lipidique est composée de **sébum** excrété par les glandes sébacées et de lipides produits par les kératinocytes. La phase aqueuse a pour origines la **sueur** et l'**eau** provenant de la perte insensible en eau transcutanée (TEWL). Le sébum s'étale sur la phase aqueuse, formant un **film**, comparable au film oculaire (Humbert, 2003).

Le film lipidique se trouve au niveau du *stratum corneum* et participe à l' « effet barrière » en maintenant à une valeur constante le pH acide cutané et en empêchant la contamination cutanée par des bactéries pathogènes. Il est composé d'acides gras poly-insaturés (25%), de cholestérol (20%) et de plus de 40% de céramides (Figure 12) (Baumann, 2002 a). Les lipides de la couche cornée sont des éléments primordiaux, permettant la cohésion entre les cornéocytes, dans le modèle « en mur de briques » (Haftek, 2003).

**Figure 12: Formules chimiques de quelques céramides présents au niveau du *stratum corneum*.**

D'après (Baumann, 2002 a)

Cette figure présente les formules chimiques de quelques céramides retrouvés au niveau du *stratum corneum*.



Le film hydrolipidique cutané est éliminé facilement par des solvants organiques et détergents (Martini, 2006).

La **composition** du film hydro-lipidique **varie sous l'influence de nombreux facteurs**. Chez le chien, elle est influencée par la **race** (Tizon, 2006). En effet, le nombre de glandes sébacées n'est pas constant d'un animal à un autre. Certaines races de chiens, comme les races à poils courts et durs possèdent un nombre de glandes sébacées beaucoup plus élevées que les autres (Mialot, 1993). L'**âge** de l'individu a aussi une influence sur la composition en lipides du *stratum corneum*. Le stress oxydant est le principal responsable des processus de dégradation cellulaire liés à l'âge : les radicaux libres produits vont initier des réactions en chaîne, aboutissant à la rupture de liaisons carbone-carbone ou carbone-hydrogène des biomolécules constituant le film lipidique. On parle de vieillissement cutané (Popa, 2007). Certaines **dermatoses**, comme la dermatite atopique, sont caractérisées par la modification de la composition du film lipidique de la couche cornée. Dans le cas de la dermatite atopique, on constate un déficit en acide arachidonique, en céramides et en acides gras oméga-6 à longue chaîne (Humbert, 2003).

Toute anomalie quantitative ou qualitative des lipides de la couche cornée de l'épiderme entraîne une augmentation de la perte insensible en eau, marqueur fidèle de l'altération de la fonction barrière (Humbert, 2003).

#### **8.1.2.2.2. Rôles**

Les lipides cutanés jouent un rôle dans les **inflammations cutanées**. Les phospholipides cutanés sont hydrolysés par la **phospholipase A2** présente dans l'épiderme et génèrent de l'acide arachidonique, précurseur de molécules pro-inflammatoires comme les prostaglandines et les leucotriènes. Les phospholipases A2 jouent un rôle central dans la physiopathologie cutanée ; une dérégulation de leur taux d'expression conduit à des **pathologies inflammatoires cutanées** comme le psoriasis, l'acné, la dermatite atopique, l'érythème dû aux rayons ultra-violet, l'eczéma... (Maury, 2003)

Les lipides cutanés ont une **action bactériostatique**. Le dégraissage cutané d'une zone précise de la peau entraîne une croissance bactérienne augmentée par rapport à une peau normale, intacte (Aly, 1972). Les lipides cutanés ont la capacité d'inhiber la croissance, *in vitro* et *in vivo*, de certaines bactéries Gram-positives comme *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp et de levures comme *Candida albicans*. Ces propriétés bactériostatiques sont qualitativement différentes

selon le sébum de l'individu considéré, et selon son âge. Elles s'exercent lorsque la population microbienne cutanée résidente est faible (Basta, 1980).

### 8.1.2.3. La flore cutanée

#### 8.1.2.3.1. Composition et physiologie de la flore cutanée

La peau d'un individu sain possède une flore bactérienne résidente **bénéfique**, dont les micro-organismes sont organisés sous forme de **biofilms**. Elle permet d'empêcher la colonisation de la peau par des bactéries pathogènes.

La peau est colonisée dès la naissance par des micro-organismes, dont le nombre et la nature varient en fonction de l'âge de l'individu et de la région anatomique concernée (Martini, 2006). Aucune zone de la peau n'a une flore représentative de la totalité de la flore cutanée (Marples, 1969). Chez l'Homme les zones les plus riches en micro-organismes sont, respectivement, par ordre décroissant : la main, le cuir chevelu, l'ars, le front, les membres et le dos (Martini, 2006). On distingue une flore cutanée bactérienne et fongique. On s'intéressera dans la suite de l'exposé uniquement à la flore cutanée bactérienne.

La **flore cutanée bactérienne du jeune enfant** est constituée des micro-organismes suivants : *Streptococcus albus*, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, streptocoques et corynebactéries. A l'adolescence, la flore s'enrichit en coques (Martini, 2006).

La **flore cutanée bactérienne de l'adulte** est, quant à elle, composée essentiellement de bactéries Gram positives, appartenant à trois genres principaux (Martini, 2006), (Chiller, 2001) :

- Genre ***Staphylococcus*** : *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus* (portage asymptomatique dans les cavités nasales chez l'Homme, dans 20% des cas, (Iwatsuki, 2006)), *Staphylococcus hominis*. *Staphylococcus epidermidis* est le micro-organisme le plus abondamment représenté au sein de la flore commensale cutanée (Masako, 2005),
- Genre ***Corynebacterium***,
- Genre ***Propionibacterium*** : *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium avidum*.

On trouve aussi des bactéries du genre ***Lactobacillus*** (Nielsen, 1975).

La **flore cutanée fongique** est moindre par rapport à la flore cutanée bactérienne. Une augmentation du nombre de champignons saprophytes peut être à l'origine de mycoses, lors de la modification de certains paramètres cutanés comme l'humidité ou le pH. Les principaux micro-organismes fongiques rencontrés sont *Malassezia furfur* et *Candida albicans* (Martini, 2006).

La microflore cutanée utilise le sébum présent à la surface de la peau comme nutriment. Il y a une véritable symbiose entre microflore cutanée et peau (Masako, 2005).

La microflore cutanée peut être éliminée par différents procédés. L'utilisation de chlorhexidine entraîne une réduction significative de la croissance de la flore cutanée aérobie et anaérobie superficielle et profonde (Nielsen, 1975).

#### **8.1.2.3.2. Rôles de la microflore cutanée**

Les micro-organismes de la flore cutanée protègent la peau de l'hôte de l'invasion de bactéries pathogènes, de façon directe et indirecte (Chiller, 2001).

On peut citer comme **mécanismes de protection directe** :

- la production de **bactériocines**<sup>25</sup> ou de **métabolites toxiques**,
- des **mécanismes de compétition** pour les phénomènes d'adhérence et d'adhésion à la surface de la peau dans le cadre de la formation de biofilms.  
Par exemple, *Staphylococcus epidermidis*, qui fait partie de la flore cutanée résidente de l'Homme, peut empêcher *Staphylococcus aureus* de se fixer à la surface de la peau et de former un biofilm, en se liant de façon compétitive aux récepteurs des kératinocytes. *Staphylococcus epidermidis* inhibe donc de façon compétitive l'une des premières phases de formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* : l'adhérence au support, ici, la peau (Bibel, 1983).
- Des **mécanismes d'inhibition de la croissance** des micro-organismes pathogènes. Par exemple, la production d'acides gras issus de la lipolyse réalisée par *Propionibacterium acnes* acidifie le milieu cutané et inhibe de ce fait la croissance de *Streptococcus pyogenes* (Hentges, 1993).

---

<sup>25</sup> Les bactériocines sont des polypeptides d'origine bactérienne, dotés de propriétés bactéricides et bactériostatiques, actifs sur la membrane des bactéries Gram- positives

Les **mécanismes de protection indirecte** de l'invasion de bactéries pathogènes par les micro-organismes de la flore cutanée sont la **stimulation de la phagocytose** et de la **production d'anticorps et de cytokines** (Chiller, 2001).

La flore cutanée participe à la **défense de la peau**. Seule une prolifération excessive des micro-organismes saprophytes peut engendrer des troubles cutanés. Des mesures d'hygiène sont donc indispensables mais ne doivent pas, par leur fréquence et leur qualité, rompre l'équilibre du milieu cutané.

La flore cutanée résidente participe au **maintien de la fonction barrière de l'épiderme**, par la production d'**enzymes**, des céramidases par exemple, intervenant dans des réactions métaboliques impliquant les lipides de la couche cornée (Humbert, 2003).

La flore cutanée résidente, organisée sous forme de biofilms, a une présence bénéfique pour l'hôte, puisqu'elle le préserve de l'invasion et de la colonisation de bactéries pathogènes. Toute modification de l'équilibre de la flore bactérienne, autrement dit **toute rupture de l'homéostasie bactérienne**, entraîne des troubles cutanés et est à l'origine de **dermatoses**.

## **8.2. Biofilms et peau**

Comme nous l'avons déjà vu, la formation de biofilms est influencée par le type de support. De façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité d'une surface et la présence préalable de films protéiques influencent l'attachement des micro-organismes à cette surface et favorisent la formation d'un biofilm. Les biofilms se fixent plus facilement sur des surfaces recouvertes de protéines ou de glucides que sur des surfaces recouvertes de lipides. En dermatologie, la couche cornée constitue un mauvais support pour la formation de biofilms, par la présence de lipides et le renouvellement permanent des cornéocytes (désquamation). Lors d'hyperkératose, la couche cornée devient plus épaisse et plus rugueuse, ce qui favorise davantage la formation de biofilms. Le collagène présent dans le derme et les érosions et ulcères présents à la surface de la peau offrent un substrat protéique aux micro-organismes et constituent donc un bon support pour la formation de biofilms. De même, la kératine du poil offre un support idéal pour la formation de biofilms, ce qui peut expliquer les réactions inflammatoires déclenchées par la présence de corps étrangers endogènes dans le derme, en particulier lors de poil incarné.

Ainsi, la peau constitue un **environnement peu propice à la colonisation bactérienne**. La présence d'une colonisation bactérienne permanente à la surface de la peau s'explique par la capacité des bactéries à adhérer à la couche cornée de l'épiderme et à croître dans un milieu sec et relativement acide. Ces bactéries sont aussi capables de se fixer à nouveau à la peau, lors du phénomène physiologique de la desquamation (Feingold, 1986).

Les biofilms présents à la surface d'une peau saine sont constitués de micro-organismes faisant partie de la flore commensale cutanée. **L'homéostasie bactérienne à la surface de la peau est garante d'une peau saine, sans désordres cutanés**. Toute **rupture de l'homéostasie bactérienne cutanée** est à l'origine **de troubles cutanés** et de l'apparition de **dermatoses**. Ces dermatoses sont généralement **très difficiles à traiter**. Si les micro-organismes responsables de la dermatose font normalement partie de la flore commensale cutanée, c'est un dérèglement aboutissant à leur multiplication qui explique les troubles cutanés (Burkhart, 2003).

Les résultats de mise en culture de prélèvements de flore cutanée chez l'Homme ou chez l'animal sains mettent en évidence différents micro-organismes. Inversement, lors de dermatose, les résultats de mise en culture des prélèvements mettent en général en évidence la présence d'un seul micro-organisme responsable des troubles cutanés observés. Le mode de comportement prédominant des micro-organismes étant le mode de vie en biofilm, et la plupart étant hétérogènes, on peut penser que la **flore cutanée** est composée de **biofilms hétérogènes** et que les **dermatoses** sont causées par des **biofilms homogènes**. En effet, chaque dermatose est caractérisée par un micro-organisme donné. Par exemple, des biofilms de *Staphylococcus aureus* sont responsables de dermatite atopique sèche, alors que des biofilms de *Propionibacterium acnes* entraîneront le développement d'acné.

Les biofilms présents à la surface de la peau jouent aussi un rôle dans le processus de cicatrisation.

### **8.2.1. Biofilms et cicatrisation. Exemple des plaies chroniques.**

Les plaies chroniques sont dues à la présence de biofilms bactériens « pathogènes ». La **charge bactérienne élevée** au niveau de la plaie rompt l'homéostasie cutanée et bloque le processus de cicatrisation en phase inflammatoire. Les **ulcères de décubitus** (escarres), les **ulcères veineux** des jambes, et les **ulcères « du pied diabétique »** sont des exemples de plaies chroniques. Les individus prédisposés au développement de plaies chroniques sont les personnes souffrant de diabète et de maladies cardio-vasculaires, comme les individus obèses par exemple (Bjarnsholt, 2008).

#### **8.2.1.1. Pathogénie**

Les **ulcères veineux** des jambes sont dus à un mauvais fonctionnement des clapets anti-retour présents dans les veines. Il en résulte une **hypertension veineuse** dans la veine saphène interne crurale, et par conséquent une augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires aboutissant à la formation d'un **œdème**. Une pression veineuse supérieure à 45 mm Hg conduit inévitablement au développement d'un ulcère veineux. Le traitement de l'ulcère veineux est la compression, qui permet souvent la cicatrisation de l'ulcère (Bjarnsholt, 2008). De nombreuses bactéries sont rencontrées lors d'**ulcères veineux des jambes** (Tableau 5).

**Tableau 5: Bactéries responsables d'ulcères veineux de jambes :**

D'après (Gjødsbøl, 2006)

| <b>Bactéries mises en cause</b> | <b>Incidence (%)</b> |
|---------------------------------|----------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 93,5                 |
| <i>Enterococcus faecalis</i>    | 71,7                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 52,2                 |
| Staphylocoque coagulase négatif | 45,7                 |
| <i>Proteus spp</i>              | 41,3                 |
| Bactéries anaérobies            | 39,1                 |

Les **ulcères du pied diabétique** résultent de troubles neuropathiques (perte de sensibilité) et ischémiques (nécrose). Au moindre choc, une plaie peut se former. Les **escarres de décubitus** sont des lésions cutanées d'origine ischémique liées à une compression des tissus mous entre un plan dur et les saillies osseuses (épaules, chevilles...). Le traitement des escarres passe par la pose de pansements, de matelas rembourrés et le déplacement du patient.

#### **8.2.1.2. Comment expliquer la chronicité de ces plaies ?**

La **cicatrisation** d'une plaie est un processus qui se déroule en plusieurs phases :

- phase inflammatoire (phase essentiellement vasculaire),
- phase de détersion (phagocytose intense, apparition de pus),
- phase de réparation (granulation, épithélialisation),
- phase de maturation (orientation des fibres de collagène).

Certains facteurs peuvent ralentir la cicatrisation : immunodépression (liée à un cancer par exemple), malnutrition, toxicomanie, alcoolisme, tabagisme...

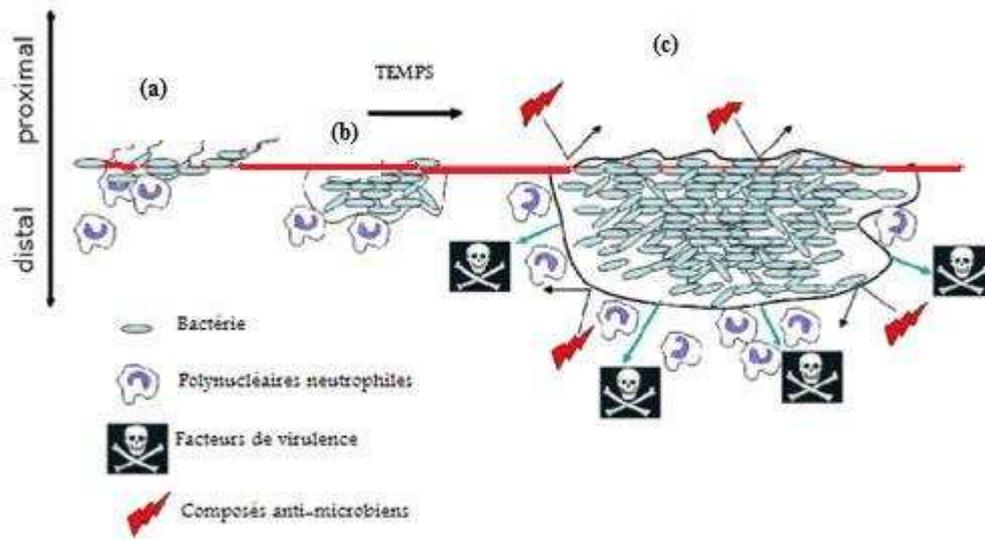
Les **plaies chroniques** sont figées dans la phase **inflammatoire de la cicatrisation** (Bjarnsholt, 2008). Cette phase est caractérisée par un afflux permanent de polynucléaires neutrophiles, qui relarguent des enzymes cytotoxiques dans le milieu environnant et conduisent à des dommages des tissus avoisinants. Le membre infecté est tuméfié, douloureux, oedématié et accompagné d'une perte de fonction.

C'est la **charge bactérienne importante** qui est responsable du **maintien de la plaie dans la phase inflammatoire du processus de cicatrisation**. La **persistance bactérienne** et les moyens de défense vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles de l'hôte sont permis par le mode de vie des bactéries sous forme de **biofilms** (Bjarnsholt, 2008). Les mécanismes à l'origine de la formation de plaies chroniques sont résumés dans la figure 13.

### Figure 13 : Mécanismes du maintien d'une infection chronique au niveau d'une plaie

D'après (Bjarnsholt, 2008)

En (a), des bactéries planctoniques et des polynucléaires neutrophiles affluent au niveau du site de la plaie : il s'agit de la phase inflammatoire de la cicatrisation. En (b), les bactéries continuent d'affluer et colonisent la plaie. On est toujours en phase inflammatoire de la cicatrisation. Puis, en (c), les bactéries s'organisent en biofilms, synthétisent des facteurs de virulence et deviennent résistantes aux composés anti-microbiens et à l'action des polynucléaires neutrophiles. Les bactéries persistent donc sur le site de la plaie sous forme de biofilms et bloquent la cicatrisation dans sa phase inflammatoire.



Ainsi, la présence de biofilms au niveau de certaines plaies engendre un **maintien de l'inflammation** (afflux massif d'effecteurs de la réponse immune, inefficace sur les biofilms) **et de l'infection** (charge bactérienne importante). L'application topique d'ions argent au niveau de la plaie pourrait initier un processus de cicatrisation (Bjarnsholt, 2008).

L'homéostasie bactérienne cutanée est aussi rompue lors de dermatoses, comme la dermatite atopique ou l'acné vulgaire par exemple.

## **8.2.2. Dermatite atopique et biofilms**

### **8.2.2.1. La dermatite atopique sèche : définition et traitements actuels**

#### **8.2.2.1.1. Etiopathogénie de la dermatite atopique**

La dermatite atopique sèche est une **maladie inflammatoire chronique spécifique d'antigène**. Il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité de type I, médiée par les IgE, et caractérisée par une infiltration cutanée de cellules mononucléées : les lymphocytes T (Bosset, 2000 ; Wolff, 2005).

La dermatite atopique débute rarement à l'âge adulte. Chez l'Homme, elle se déclare habituellement au cours de l'enfance, 60% des cas étant des patients âgés de moins d'un an (Wolff, 2005). Chez le chien, elle se déclare généralement entre 1 et 3 ans. La dermatite atopique est souvent associée à des **antécédents familiaux** d'atopie, même si le mode de transmission de la maladie n'a pas encore été mis en évidence. Les critères épidémiologiques pour la dermatite atopique chez le chien sont recensés en critères majeurs et mineurs, appelés critères de Willemse (Tableau 6) (Bensignor, 2005).

Les facteurs favorisant le déclenchement d'une poussée de dermatite atopique sont les aéro-allergènes, les agents microbiens et certains aliments (poisson, œuf, lait, cacahuètes...).

La dermatite atopique se caractérise **chez l'Homme** par une **xérose** (sécheresse cutanée), avec **anomalies de la barrière cutanée** et par des **troubles inflammatoires polymorphes** associant **troubles vasomoteurs, lésions urticariennes et lésions d'eczéma aigu, subaigu ou chronique**. Ces troubles inflammatoires sont à l'origine d'un prurit (Bosset, 2000 ; Wolff, 2005). **Chez le chien**, les signes cliniques de dermatite atopique peuvent être nombreux : prurit chronique récidivant, dermatite chronique récidivante, otites externes chroniques, lichénification des plis de l'ars et de l'aîne, hyperhydrose. On distingue de façon caractéristique une atteinte de la face (cheilite), des oreilles (otites externes), des pattes (atteinte interdigitée et lichénification du carpe) et de l'ars (Tableau 6).

**Tableau 6 : Critères de diagnostic de la dermatite atopique chez le chien :**

**Critères de Willemse**

D'après (Bensignor, 2005 ; Reedy, 1997)

| <b><u>Critères majeurs (au moins trois)</u></b>   | <b><u>Critères mineurs (au moins trois)</u></b>                                 |
|---|---|
| Prurit  | Apparition avant l'âge de 3 ans   |
| Atteinte de la face et/ou des membres   | Réactions positives aux IDR <sup>26</sup> ou aux tests sérologiques spécifiques |
| Lichénification de la face dorsale du tarse ou du carpe   | Pyodermite superficielle à staphylocoque récidivante                            |
| Dermite chronique ou chroniquement récidivante  | Dermatite à <i>Malassezia</i> récidivante                                       |
| Prédisposition raciale (Shar Pei, West Highland White Terrier, Boxer, Dalmatien, Berger Allemand...) ou antécédents individuels ou familiaux d'atopie | Otite externe récidivante   |
|   | Conjonctivite bilatérale récidivante  |
|   | Erythème facial et cheilite   |
|   | Xérose et/ou hyperhydrose   |

Un chien est considéré comme atopique si au moins trois critères majeurs et trois critères mineurs sont présents.

Une **altération de la barrière cutanée**, entraînant une déshydratation cutanée importante, aggraverait les lésions de dermatite atopique (Wolff, 2005).

<sup>26</sup> IDR signifie Intra- Dermo Réaction.

### 8.2.2.1.2. Traitements actuels de la dermatite atopique

#### 8.2.2.1.2.1. Avantages et inconvénients des divers traitements

Les **dermocorticoïdes** sont le meilleur traitement actuel, à condition de les utiliser correctement et sous surveillance d'un médecin, afin de limiter au maximum les effets secondaires indésirables. En cas d'utilisation prolongée, ils peuvent être à l'origine d'une **atrophie cutanée** (Wolff, 2005).

Des nouveaux topiques anti-inflammatoires non stéroïdiens sont de bons candidats au remplacement des dermocorticoïdes : il s'agit du **pimécrolimus** et du **tacrolimus**. Ils ont une action anti-prurigineuse et anti-inflammatoire, et contrairement aux dermocorticoïdes, ils n'entraînent pas d'atrophie cutanée (Wolff, 2005).

Les **antihistaminiques** n'ont pas d'efficacité démontrée contre la dermatite atopique. L'emploi d'anti- IgE reste controversé (Bosset, 2000).

Enfin, la **désensibilisation spécifique** par injection sous-cutanée d'allergènes purifiés en très faibles quantités ne donne pas de résultats satisfaisants pour le traitement de la dermatite atopique. L'**immunothérapie peptidique** (blocage de la réponse des lymphocytes T par des petits fragments peptidiques d'allergènes) est, quant à elle, une stratégie thérapeutique envisageable (Bosset, 2000).

Des études suggèrent que des **vaccinations** pourraient être utiles dans le traitement de l'atopie. Ces vaccinations induiraient une réaction lymphocytaire de type TH1, qui préviendrait le développement ultérieur de l'atopie (Bosset, 2000).

#### 8.2.2.1.2.2. Démarche thérapeutique fréquemment mise en place

L'algorithme de traitement de la dermatite atopique est le suivant (Wolff, 2005) :

- Traitement de la xérose par application topique d'**émollients**
- Traitement des poussées légères à modérées par du **pimécrolimus topique**, éventuellement associé à des émollients
- Traitements des poussées sévères par application locale de **dermocorticoïdes**, puis relais avec **pimécrolimus ou tacrolimus** et **émollients**.

- Eradication de *Staphylococcus aureus* par **antibiothérapie** systémique ou topique. On verra par la suite quelles sont les limites du traitement antibiotique de la dermatite atopique.

#### **8.2.2.2. Dermatite atopique sèche et biofilms**

*Staphylococcus aureus* est très rarement isolé sur une peau saine, mais est retrouvé sous forme de biofilms homogènes en grande quantité chez les patients atteints de **dermatite atopique sèche**, et pas seulement localisé au niveau des zones fortement atteintes. Il existe une corrélation positive entre le nombre de biofilms de *Staphylococcus aureus* et les lésions cutanées chez les patients atteints de dermatite atopique (Masako, 2005). *Staphylococcus aureus* libère in situ de nombreuses enzymes et toxines (Masako, 2005 ; Iwatsuki, 2006). La peau est lésée, et même des soins hydratants ne suffisent pas à rétablir l'équilibre de la flore cutanée chez les sujets atopiques (Masako, 2005).

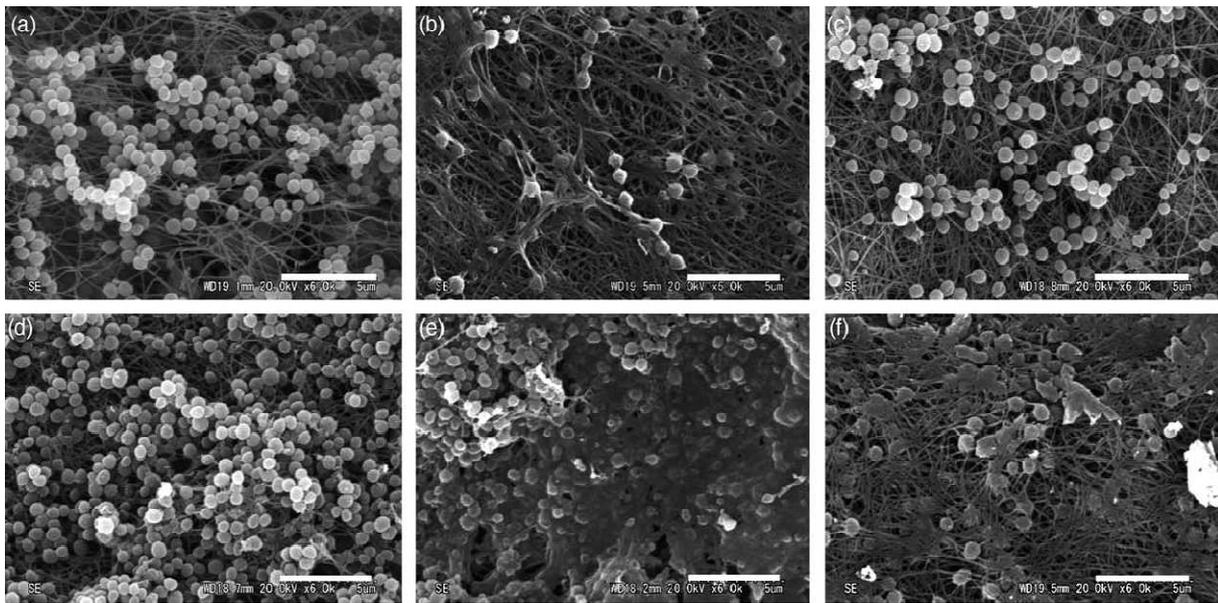
On peut aussi préciser que, lors de dermatite atopique, certains lipides ayant des propriétés bactéricides et présents à la surface de la peau ont une **composition modifiée**, notamment les **sphingosines**.

L'utilisation de techniques comme la microscopie électronique à balayage permet de visualiser des biofilms de *Staphylococcus aureus* à la surface de la peau d'un patient atteint de dermatite atopique sèche (Photographie 5).

**Photographie 5 : Observation à la microscopie électronique à balayage de biofilms de *Staphylococcus aureus* provenant de la peau de sujets atteints de dermatite atopique sèche.**

D'après (Masako, 2005), avec accord

Les photographies (a), (b), (c), (d), (e) et (f) ont été obtenues par des techniques de microscopie électronique à balayage. Elles montrent des biofilms de *Staphylococcus aureus* présents à la surface de la peau de patients atteints de dermatite atopique sèche.

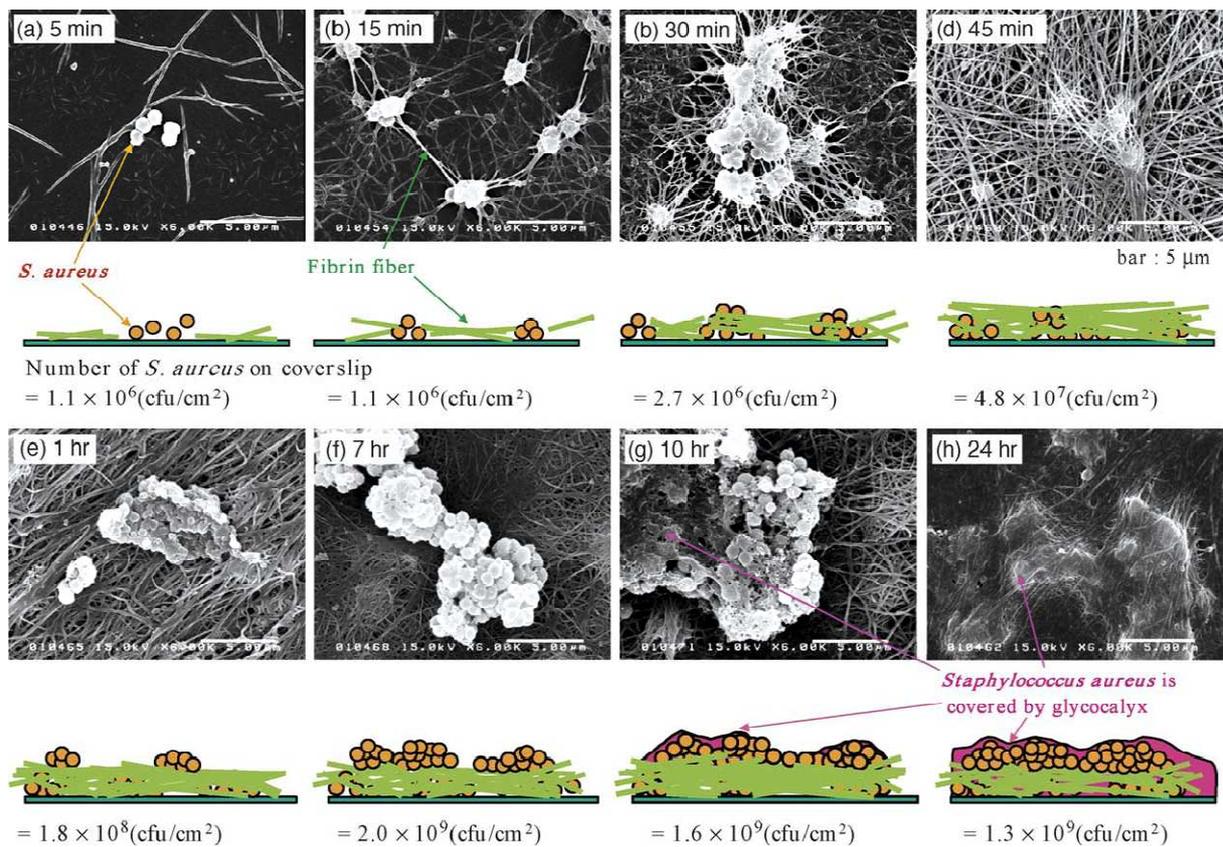


La formation des biofilms de *Staphylococcus aureus* se fait en 24 heures, leur maturité est atteinte en 3 jours. Des clichés réalisés sous microscopie électronique à balayage ont permis de suivre les différentes étapes de formation de biofilms de *Staphylococcus aureus* chez des sujets atteints de dermatite atopique sèche (Figure 14) (Masako, 2005).

**Figure 14: Processus de formation d'un biofilm de souches de *Staphylococcus aureus* provenant de la peau d'un patient atteint de dermatite atopique sèche. Images obtenues par microscopie électronique à balayage.**

D'après (Masako, 2005), avec accord

Après 5 minutes d'incubation, des fibres de fibrine entourent les bactéries [(a), (b), (c)]. Au bout de 45 minutes, les bactéries sont enfermées dans un véritable réseau de fibres de fibrine (d). Au bout de 7 heures, les bactéries utilisent le maillage de fibrine comme support et croissent [(e), (f)]. Les bactéries synthétisent du glycocalyx, qui va former une véritable gangue autour des micro-organismes. Le biofilm termine sa formation au bout de 24h, et devient complètement mature en 3 jours (h).



### **8.2.2.3. Problématique posée par la dermatite atopique en matière de stratégie thérapeutique**

La plupart des **traitements hydratants de qualité** n'ont **pas vraiment d'efficacité** sur les peaux sèches atopiques, et auraient plutôt tendance à fragiliser la barrière cutanée. En effet, certains **traitements hydratants de longue durée** chez des patients à peau saine ou à peau sèche peuvent aboutir à terme à une **fragilisation de la barrière cutanée**, à une **sécheresse cutanée**, mesurée de façon expérimentale par la perte insensible en eau transcutanée (TEWL) et à une **augmentation de la sensibilité aux substances irritantes** (Buraczewska, 2007). Cette altération de l'« effet barrière » de l'épiderme augmente le risque de colonisation bactérienne cutanée et de formation de biofilms. Ceci a pour conséquence l'apparition d'une dermatose ou l'aggravation d'une dermatose déjà existante.

Des **antibiotiques** et des **agents antimicrobiens** sont souvent utilisés pour éliminer les bactéries pathogènes sur la peau, mais ils sont **irritants**, et majorent les lésions cutanées. L'inconvénient dans l'utilisation d'antibiotiques pour traiter la dermatite atopique provient de la valeur de sa **concentration minimale inhibitrice**. La concentration minimale inhibitrice de l'ampicilline est la même pour *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, d'où l'inconvénient d'utiliser cet antibiotique dans le traitement de la dermatite atopique sèche, puisque l'on va éliminer aussi *Staphylococcus epidermidis* et par conséquent **déséquilibrer la flore cutanée** et fragiliser d'autant plus la peau. Les agents antimicrobiens utilisés à des concentrations inadéquates enlèvent la totalité des bactéries présentes à la surface de la peau, y compris les bactéries résidentes. La peau est ainsi privée de ses moyens de défenses locaux et est donc fragilisée. Les bactéries pathogènes peuvent à nouveau envahir la peau. Le traitement est d'autant plus compliqué que *Staphylococcus aureus* croît rapidement et est antibiorésistant. Il serait intéressant de développer des stratégies thérapeutiques qui élimineraient *Staphylococcus aureus* de façon sélective, tout en préservant *Staphylococcus epidermidis*. Une étude réalisée au Japon en 2002 montre que l'utilisation de crème ayant un pH bas et composée de gluco-oligosaccharides inhibe l'attachement de *Staphylococcus aureus* aux cellules épithéliales cutanées, et préserve la flore cutanée (Akiyama, 2002).

Les traitements antibiotiques sont la plupart du temps **inefficaces** (Masako, 2005). Il est intéressant de rechercher des moyens de lutte, autres que l'antibiothérapie, contre les biofilms de *Staphylococcus aureus* responsables des lésions rencontrées dans la dermatite atopique sèche.

#### **8.2.2.4. Proposition d'une nouvelle stratégie thérapeutique pour la dermatite atopique**

Compte-tenu de la relative inefficacité du traitement antibiotique contre la dermatite atopique sèche, il est nécessaire de chercher et de mettre au point de nouvelles méthodes qui permettraient d'éliminer les biofilms de *Staphylococcus aureus*, tout en préservant l'équilibre de la flore cutanée. Ce fut le sujet d'une étude réalisée en 2005 par Masako et son équipe (Masako, 2005). Des prélèvements de flore cutanée ont été réalisés sur 22 patients atteints de dermatite atopique (prélèvements avec une éponge) ont été réalisés. L'observation de ces échantillons de flore cutanée avec un microscope électronique à balayage a permis de mettre en évidence des souches de *Staphylococcus aureus* chez ces individus. Il a été démontré qu'il existe une **corrélation positive** entre les **lésions cutanées** de dermatite atopique et le **nombre de *Staphylococcus aureus* sur la peau** (Masako, 2005).

Les résultats de cette même étude montrent que deux molécules, le xylitol et le farnesol, ont des effets sélectifs sur la flore microbienne cutanée et inhibent de façon synergique la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus* (Masako, 2005).

Le **farnesol** est un composé organique naturel. Il s'agit d'un **alcool acyclique**, insoluble dans l'eau et soluble dans l'huile, retrouvé dans de nombreuses huiles essentielles (citronnelle, rose, musc ...) et même dans les phéromones de certains insectes. Le farnesol empêche la formation de fibrine par les biofilms de *Staphylococcus aureus* et détruit les fibres de fibrine déjà formées, même à très basses concentrations (0,02%). La concentration minimale inhibitrice du farnesol pour *Staphylococcus aureus* est plus basse que pour *Staphylococcus epidermidis* donc le **farnesol inhibe de façon sélective la croissance de *Staphylococcus aureus*** (Masako, 2005).

Le **xylitol**, ou (2, 3, 4, 5)- tétrahydroxypentanol (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>), est un **polyol** extrait de l'écorce naturelle de bouleau. Le xylitol est un substitut du sucre classique, souvent utilisé dans des chewing-gum compte-tenu des ses propriétés utiles dans la lutte contre la formation de la plaque dentaire, et caractérisé par ses propriétés rafraichissantes pour l'haleine. Le xylitol empêche la formation du glycocalix, caractéristique des biofilms de *Staphylococcus aureus* (Masako, 2005).

Un **essai clinique en simple aveugle** a été mené sur 6 patients atteints de dermatite atopique sèche. Deux lots sont créés en fonction du traitement administré : une crème composée de 0,2% de farnesol et de 5% de xylitol, et une crème placebo. Puis la microflore cutanée des patients des deux lots a été prélevée et analysée. Les résultats de cet essai

clinique montrent que l'application de crème composée de 0,2% de farnesol et de 5% de xylitol sur des peaux sèches atopiques réduit de façon significative le nombre de *Staphylococcus aureus* par rapport à l'utilisation d'une crème placebo et par rapport à l'état initial du patient (Masako, 2005).

Ainsi, l'utilisation d'une crème à base de xylitol et de farnesol peut se révéler utile dans le traitement de la dermatite atopique sèche. Les effets synergiques du xylitol et du farnesol permettent d'empêcher la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus*, ou de les éliminer, tout en **préservant l'équilibre de la microflore cutanée**.

### **8.2.3. Acné et biofilms**

L'acné est une pyodermite profonde. Chez l'Homme, l'origine de la dermatose serait une anomalie du métabolisme de certains acides gras, des rétinoïdes et/ ou des androgènes. Chez le chien et le chat, il s'agit d'un trouble primaire de la kératinisation et/ou du fonctionnement pilo-sébacé, rapidement compliqué d'infections bactériennes (Bensignor, 2005). Chez le chien et le chat, on peut parler d'état kérato-séborrhéique. Les lésions cutanées observables résultent de l'inflammation de l'unité pilo-sébacée. Les lésions d'acné chez le chien sont caractérisées par des comédons, des papulo-pustules folliculaires et des furoncles localisés au menton et aux lèvres (Bensignor, 2005).

Des biofilms présents en profondeur dans l'unité pilo-sébacée sont responsables des lésions cutanées d'acné. Ils sont composés par des micro-organismes de la flore cutanée résidente de l'Homme : *Propionibacterium acnes*. Il n'existe a priori pas de relation entre le nombre de bactéries et l'apparition des lésions (Burkhart, 2003).

Les peaux jeunes sont les principales concernées par l'acné, mais ce ne sont pas les seules. L'apparition des lésions ne dépend pas uniquement de la flore bactérienne du patient : « le germe n'est rien, le terrain est tout ». Aussi, une personne d'une quarantaine d'années pourra développer des lésions d'acné si la flore de son follicule pileux compte parmi ses membres des bactéries du genre *Propionibacterium acnes* formant des biofilms responsables de lésions d'acné (Burkhart, 2003).

Le **traitement** de l'*acne vulgaris* est **difficile**, puisque les **récidives** sont nombreuses, comme dans toutes les infections où les biofilms sont impliqués.

### **8.3. Application à la prescription de topiques en dermatologie. Pistes de réflexion.**

#### **8.3.1. Prescription raisonnée d'un topique en dermatologie**

Les facteurs à prendre en compte pour en mettre en place une **prescription raisonnée** d'un topique dermatologique pour le traitement d'une dermatose donnée sont nombreux. Le but du traitement topique est d'**éliminer les biofilms** des micro-organismes responsables de la dermatose, tout en **préservant la microflore cutanée** résidente et en **évitant toute altération de la fonction barrière** de l'épiderme.

##### **8.3.1.1. Facteurs dépendants de la dermatose**

Il faut tout d'abord **identifier** le ou les **micro-organismes** responsables de la dermatose. Si le praticien choisit de mettre en place une **antibiothérapie locale**, il faut déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des micro-organismes responsables de la dermatose et la comparer aux CMI des bactéries de la flore résidente cutanée. L'intérêt est d'utiliser une molécule dont la CMI pour le micro-organisme responsable est inférieure à la CMI pour les bactéries de la flore cutanée résidente. Ceci permet de réaliser une **élimination sélective** du ou des micro-organismes pathogènes en cause, tout en **préservant la flore cutanée** bénéfique. Ceci nécessite de créer une **banque de données de CMI** pour les micro-organismes de **chaque dermatose** !

Si le praticien souhaite utiliser une **substance bactéricide autre que les antibiotiques**, comme l'eau oxygénée, la chlorehexidine, la povidone iodine ou certains alcools, il doit être certain de l'efficacité de la substance sur le ou les micro-organismes qu'il souhaite éliminer. Par exemple, l'eau oxygénée à une concentration de 3 et 5%, et certains alcools, comme le N-propanol ou des préparations commerciales à base de propanol, d'éthanol et de chlorhexidine, permettent une éradication rapide de biofilms de *Staphylococcus epidermidis* alors que la povidone iodine, pourtant largement utilisée en milieu hospitalier est beaucoup moins efficace. Il faut toutefois faire attention à l'effet irritant de l'eau oxygénée sur la peau lors d'utilisations trop répétées ou à des concentrations trop élevées (Presterl, 2007).

Il est nécessaire d'évaluer le degré de d'altération de la barrière cutanée avant de mettre en place un traitement, afin de ne pas aggraver les lésions. En effet, toute dermatose va entraîner une alcalinisation du pH cutané et une altération de la barrière cutanée (Martini, 2006). Dans le cas de la dermatite atopique sèche, la xérose est un signe d'altération de l'effet barrière.

### **8.3.1.2. Facteurs dépendants de l'individu**

Le choix du topique dermatologique dépend de la **qualité de la barrière de l'épiderme** de l'individu. Cette dernière est sous l'influence de plusieurs facteurs notamment du **type de peau** (sèche, grasse, sensible) et de l'**âge** de l'individu. La composition en lipides épidermiques se modifie avec l'âge, par conséquent la fonction barrière de l'épiderme diminue avec l'âge. On parle de vieillissement cutané.

Le choix du topique dermatologique dépend de la **nature de la flore cutanée résidente**, mais pas seulement. Selon l'**âge** de l'individu et la **région anatomique concernée**, les micro-organismes ne sont pas les mêmes : la flore cutanée résidente est différente chez le jeune enfant et chez les personnes âgées, et diffère aussi selon les localisations: oreille, bras, pli du genou...

### **8.3.1.3. Facteurs dépendants de la nature de la molécule**

#### **8.3.1.3.1. Capacité de pénétration cutanée**

La prescription raisonnée d'un topique en dermatologie doit prendre en compte sa **capacité de pénétration cutanée**, qui doit être adaptée au type de dermatose à traiter : dermatose superficielle ou profonde.

L'absorption transcutanée est un phénomène de **diffusion passive** s'exerçant au niveau de chacune des couches de la peau. On distingue différents mécanismes de passage transcutané des topiques dermatologiques (Martini, 2006) :

- **Passage transcellulaire** (molécules hydrophiles de petite taille),
- **Passage intercellulaire** via le ciment lipidique (molécules lipophiles et amphiphiles),
- **Passage par le follicule pileux** ou par le canal sudoripare des glandes eccrines (rare).

La capacité de pénétration cutanée d'un topique dépend de plusieurs facteurs (Martini, 2006) :

- **Taille de la molécule** : la pénétration cutanée est d'autant plus facilitée que la masse moléculaire est peu élevée (<500 Da),
- **Forme de la molécule** : les molécules peu ramifiées passent plus facilement entre les cornéocytes que les molécules très ramifiées,
- **Nature chimique de la molécule** : les molécules lipophiles ont tendance à s'accumuler dans le film lipidique entre les cornéocytes, alors que les molécules hydrophiles traversent la peau plus facilement, dans le cas où son degré d'hydratation est suffisant. Les molécules traversant le plus facilement la peau sont les **molécules amphiphiles**.
- **Excipient adapté** : Il faut choisir un topique avec l'**excipient adéquat** en fonction de son degré de pénétration cutanée, selon la **localisation de la dermatose** (superficielle/profonde). Pour traiter une dermatose superficielle, on choisira une formulation de topique avec une faible pénétration cutanée.

#### **8.3.1.3.2. pH de la molécule**

Le pH de la molécule est un critère à prendre en compte. Les dermatoses s'accompagnent le plus souvent d'une alcalinisation de la peau. On évitera donc d'utiliser des préparations alcalines (Martini, 2006).

#### **8.3.1.3.3. Pouvoir irritant**

Certaines molécules contenues dans des topiques dermatologiques peuvent engendrer un prurit. Il faut donc faire attention à l'**effet irritant** de certaines substances sur les peaux sensibles.

#### **8.3.1.4. Durée du traitement**

La prescription raisonnée d'un topique dermatologique repose sur deux choix fondamentaux : le choix de la molécule mais aussi de la **durée du traitement**.

Il faut veiller à préserver l'effet barrière de la couche cornée pour ne pas aggraver les troubles dermatologiques déjà présents. Par exemple, les **traitements hydratants de trop longue durée** altèrent l'effet barrière du *stratum corneum* et peuvent affecter sa capacité de récupération. L'altération de l'effet barrière du *stratum corneum* est mesurée par la perte en eau transcutanée (Buraczewska, 2007).

#### **8.3.1.5. Conclusion : prescrire un topique de façon raisonnée**

La prescription d'un topique dermatologique doit comporter les étapes suivantes, résumées dans le tableau 7 :

#### **Tableau 7 : Démarche à adopter pour la prescription raisonnée d'un topique dermatologique:**

- Identification rigoureuse des **micro-organismes** impliqués dans la dermatose à traiter
- Bonne connaissance des **propriétés physico-chimiques** de la molécule à utiliser (bien lire le RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit)
- Prendre en compte les **caractéristiques de l'individu** dont on veut traiter la dermatose : âge de l'individu, localisation de la dermatose, altération ou non de la barrière cutanée...
- Bien se souvenir que **tout traitement topique dermatologique doit préserver l'équilibre physiologique de la microflore bactérienne cutanée. Il ne doit pas y avoir de rupture de l'homéostasie bactérienne.**

### **8.3.2. Propositions de voies de recherche sur la problématique des biofilms en dermatologie**

Pour établir un protocole de recherche dont le but est de déterminer quel agent topique est le plus adapté pour le traitement d'une dermatose donnée, il faut tout d'abord procéder au recensement des principales dermatoses rencontrées chez l'Homme et l'animal, avec dans chaque cas les micro-organismes le plus fréquemment impliqués. Les principales étapes de l'étude à réaliser sont :

- **Choix d'une dermatose** fréquemment rencontrée chez l'Homme, et dont l'expression clinique est invalidante.
- **Prélever** des échantillons de flore sur des patients choisis selon des critères précis, à définir au préalable. On pourra choisir comme critère une ou deux lésions cutanées caractéristiques de la dermatose à étudier.
- **Réaliser des cultures en laboratoire. Observer les biofilms obtenus** avec des techniques modernes comme la microscopie confocale à balayage laser.
- **Tester l'efficacité de molécules**, dont la nature est à déterminer, sur les biofilms à éliminer, responsables de la dermatose. Au cours de ces études, il faudra veiller à comparer les concentrations minimales inhibitrices pour les micro-organismes à éliminer de celles pour les bactéries de la flore cutanée résidente, afin de ne pas détruire ces dernières.
- **Mettre en place un essai clinique**, afin d'établir si l'utilisation de telle ou telle molécule a une efficacité significative dans l'éradication des biofilms responsables de la dermatose choisie. Les facteurs à prendre en compte dans l'efficacité de la molécule testée sont la préservation de la flore cutanée spécifique, le maintien de la barrière épidermique.

Le but est donc de réaliser une **banque de données** réunissant les informations concernant les molécules utilisables en application topique, et dont la principale propriété est de respecter l'homéostasie cutanée, pour les dermatoses les plus fréquentes et les plus invalidantes chez l'Homme et chez l'animal. L'intérêt de ce type d'étude est de mettre en place un cahier des charges propre à chaque dermatose, et permettant de **choisir parmi les**

**molécules** étudiées lors d'essais cliniques préalables celle qui est **la plus adaptée** en fonction des caractéristiques inhérentes au patient concerné : âge, type de dermatose (superficielle/profonde), micro-organisme (s) responsable (s), localisation anatomique des lésions cutanées, altération de la barrière cutanée, type de peau (sèche, grasse...)

D'autre part, l'implication supposée de biofilms homogènes dans la formation de dermatoses ouvrent la voie à de nombreuses pistes de recherches en dermatologie. Plutôt que de détruire par des moyens mécaniques (nettoyage) ou chimiques (antibiotiques) les biofilms homogènes responsables d'une dermatose, tout en risquant d'altérer la fonction barrière de l'épiderme ; on peut se demander s'il ne serait pas préférable de traiter la dermatose en modifiant les biofilms homogènes responsables et favoriser leur transformation en biofilms hétérogènes, proches de ceux de la flore cutanée.

## CONCLUSION

Le **mode de vie en biofilm** est prédominant chez les organismes unicellulaires. L'autre alternative est la flottaison libre qualifiée de "planctonique". Cette dernière a longtemps été considérée comme leur unique forme de vie. Ce n'est que récemment que les concepts à l'origine des problématiques de recherche en biologie ont été revus, comme le montre par exemple la prise en considération des biofilms dans la transmission vectorielle de certaines maladies, comme la peste.

Comme nous l'avons repris à divers niveaux du présent travail, l'**importance des biofilms** tient, entre autres, à la formation de résistances (rôle de la matrice d'exopolysaccharides) et à la difficulté d'imprégnation par les antibiotiques. La présence de biofilms a un impact considérable, que ce soit dans l'agro-alimentaire (altérations de qualités organoleptiques), l'industrie ou le milieu médical (biofilms et infections nosocomiales). En dermatologie en particulier, ils participent à l'homéostasie cutanée, la cicatrisation mais aussi à la plupart des dermatoses.

La formation de biofilms est influencée par le **type de support**. De façon générale, la rugosité, l'hydrophobicité d'une surface et la présence préalable de films protéiques influencent l'attachement des micro-organismes à cette surface et favorisent la formation d'un biofilm. Les biofilms se fixent plus facilement sur des surfaces recouvertes de protéines ou de glucides que sur des surfaces recouvertes de lipides. **En dermatologie**, la couche cornée constitue un mauvais support pour la formation de biofilms, par la présence de lipides et le renouvellement permanent des cornéocytes par desquamation. Lors d'hyperkératose, la couche cornée devient plus épaisse et plus rugueuse, ce qui favorise davantage la formation de biofilms. Le collagène présent dans le derme et les érosions et ulcères présents à la surface de la peau offrent un substrat protéique aux micro-organismes et constituent donc un bon support pour la formation de biofilms. De même, la kératine du poil offre un support idéal pour la formation de biofilms, ce qui peut expliquer les réactions inflammatoires déclenchées par la présence de corps étrangers endogènes, en particulier lors de poil incarné.

La présence de biofilms peut avoir des **effets bénéfiques**. Comme nous l'avons vu, les biofilms présents à la surface de la couche cornée et constituant la flore commensale cutanée d'un individu sont responsables de l'homéostasie cutanée et permettent de limiter la

contamination cutanée par des micro-organismes pathogènes. D'autre part, les biofilms font l'objet de nombreuses applications industrielles. Ils sont par exemple utilisés dans des procédés de traitements des eaux usées, au sein de bioréacteurs. Néanmoins, beaucoup de biofilms sont **indésirables**, car leur présence occasionne de nombreux dégâts : dégradation de bâtiments, corrosion métallique de la coque des bateaux, infections nosocomiales dues au port d'implants, dermatoses...

La faible efficacité des antibiotiques vis-à-vis des biofilms, sur laquelle nous sommes revenus à de nombreuses reprises, explique la nécessité de rechercher d'autres moyens de lutte. Ils sont variés et font parfois appel aux nouvelles technologies (bactériophages, effet bio-acoustique). Le meilleur moyen de lutte reste le nettoyage mécanique. La supériorité de l'efficacité du nettoyage par rapport à l'utilisation de molécules antiseptiques ou antibiotiques s'illustre de façon concrète par l'exemple de l'utilisation de shampooings vétérinaires. Il est en effet plus efficace de masser le chien pendant 10 minutes avec le shampooing que de le laisser poser pendant cette même durée. Lors de l'application du shampooing, des réactions de saponification ont lieu. Ces dernières vont entraîner la solubilisation de la matrice du biofilm présent sur la couche cornée. Le massage complète l'action du shampooing et va permettre l'exfoliation cutanée et l'élimination des cornéocytes sur lesquels s'était formé le biofilm.

Comme nous l'avons vu, peu de données existent sur les biofilms cutanés et sur l'impact que peut avoir sur eux l'application d'un **topique dermatologique** prescrit lors du traitement de dermatoses. Pourtant, une prescription cohérente et raisonnée de topiques dans le cadre de la consultation de dermatologie humaine ou vétérinaire est nécessaire pour préserver l'équilibre physiologique de la micro-flore bactérienne cutanée et éviter toute rupture de l'homéostasie bactérienne. Enfin, l'implication supposée de biofilms homogènes dans la formation de dermatoses ouvrent la voie à de nombreuses pistes de recherches en dermatologie. Plutôt que de détruire par des moyens mécaniques (nettoyage) ou chimiques (antibiotiques) les biofilms homogènes responsables d'une dermatose, tout en risquant d'altérer la fonction barrière de l'épiderme ; on peut se demander s'il ne serait pas préférable de traiter la dermatose en modifiant les biofilms homogènes responsables et favoriser leur transformation en biofilms hétérogènes, proches de ceux de la flore cutanée.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1: Modèles d'infection *in vitro***

(MacLean, 2004)

**Tableau 2: Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm**

(Donlan, 2002)

**Tableau 3 : Fréquence des infections urinaires selon le type d'agent pathogène rencontré**

(Emori, 1993)

**Tableau 4: Liste de micro-organismes isolés à partir de biofilms formés sur des cathéters veineux centraux**

(Donlan, 2008)

**Tableau 5: Bactéries responsables d'ulcères veineux de jambes**

(Gjødsbøl, 2006)

**Tableau 6 : Critères de diagnostic de la dermatite atopique chez le chien : Critères de Willemse**

(Bensignor, 2005)

**Tableau 7 : Démarche à adopter pour la prescription raisonnée d'un topique dermatologique**

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1: Principe de la microscopie confocale à balayage laser**

(<http://www.jouy.inra.fr>)

**Figure 2: Cycle de développement simplifié d'un biofilm.**

(<http://www.biofilm.montana.edu>)

**Figure 3 : Infection de l'hôte par des bactéries planctoniques et stimulation de la réponse immunitaire**

(Costerton, 1999)

**Figure 4 : Mécanismes des infections chroniques causées par des biofilms : Formation d'un biofilm et stimulation de la réponse immunitaire**

(Costerton, 1999)

**Figure 5: Mécanismes des infections chroniques causées par des biofilms : Formation d'un biofilm et résistance à la réponse immunitaire de l'hôte.**

(Costerton, 1999)

**Figure 6: Mécanismes des infections chroniques causées par des biofilms : (d) Erosion du biofilm et essaimage de bactéries planctoniques.**

(Costerton, 1999)

**Figure 7: Mécanismes de formation de biofilms sur une sonde urinaire lors d'une infection du tractus urinaire liée au port de la sonde**

(Jacobsen, 2008)

**Figure 8 : Biofilms et infections nosocomiales : pourquoi le traitement médical est souvent inefficace ?**

(Utili, 2007)

**Figure 9 : Structure générale de la peau chez l'Homme**

(Martini, 2006)

**Figure 10 : Organisation structurale de l'épiderme**

(Martini, 2006)

**Figure 11: Organisation structurale du stratum corneum : le modèle « mur de briques »**

(Baumann, 2002 a)

**Figure 12: Formules chimiques de quelques céramides présents au niveau du *stratum corneum*.**

(Baumann, 2002 a)

**Figure 13: Mécanismes du maintien d'une infection chronique au niveau d'une plaie**

(Bjarnsholt, 2008)

**Figure 14: Processus de formation d'un biofilm de souches de *Staphylococcus aureus* provenant de la peau d'un patient atteint de dermatite atopique sèche.**

(Masako, 2005)

## LISTE DES PHOTOGRAPHIES

**Photographie 1: Biofilm de *Staphylococcus* spp. à la surface d'un implant médical. Image obtenue par microscopie confocale.**

(Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Image Library)

**Photographie 2: Biofilms oesophagiens chez un individu sain et un individu atteint du syndrome de Barrett.**

(Macfarlane, 2007)

**Photographie 3: Biofilm de *Proteus mirabilis* (ATCC 29906) sur du polycarbonate, obtenu par des réacteurs du Centers for Disease Control and Prevention.**

(Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Image Library)

**Photographie 4: Biofilms formés dans des canalisations d'eau potables, reproduits en laboratoire.**

(Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Image Library)

**Photographie 5: Observation à la microscopie électronique à balayage de biofilms de *Staphylococcus aureus* provenant de la peau de sujets atteints de dermatite atopique sèche.**

(Masako, 2005)

## BIBLIOGRAPHIE

- [Akiyama H, Oono T, Huh WK *et al.* (2002) Actions of gluco-oligosaccharide against *Staphylococcus aureus*. *J. Dermatol.* **29**: 580-586]
- [Aly R, Maibach HI, Shinefield HR, Strauss WG (1972) Survival of pathogenic microorganisms on human skin. *J. Investig. Dermatol.* **58**: 205-210]
- [Anderson GG, O'Toole GA (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 85-105]
- [Andrel *et al.* (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicilline and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1818-1824]
- [Archibald LK, Gaynes RP (1997) Hospital acquired infections in the United States: The importance of interhospital comparisons. *Nosocomial Inf.* **11**: 245-255]
- [Arciola CR, An YH, Campoccia D *et al.* (2005) Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int. J. Artif. Organs.* **28**: 1091- 1100]
- [Arnold H, Odom R, James W (1990) The skin : basic structure and function. *Andrew's Diseases of the Skin, 8th edition.* Arnold, Odom and James editors. Philadelphia, WB Saunders. 4]
- [Baker BB *et al.* (1973) Epidermal cell renewal in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 34-93]
- [Baumann L (2002 a) Basic Science of the epidermis. *Cosmetic dermatology. Principles and Practice.* Mc Graw-Hill. Medical Division Publishing. 3-8]
- [Baumann L (2002 b) Dry Skin. *Cosmetic dermatology. Principles and Practice.* Mc Graw-Hill. Medical Division Publishing. 29-32]
- [Becker P, Hufnagle W, Peters G *et al.* (2001) Detection of different gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **6**: 2958-2965]
- [Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 249- 289]

- [Bendinger B, Rijnaarts HHM, Altendorff K *et al.* (1993) Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3973-3977]
- [Bensignor E, Germain PA (2005) Dermatologie du chien et du chat. Collection Guide Pratique. Editions Medcom. 56-60]
- [Bibel DJ, Aly R, Shinefield HR, Maibach HI (1983) The *Staphylococcus aureus* receptor for fibronectin. *J. Invest. Dermatol.* **80**: 494-496]
- [Bjarnsholt T, Jensen P, Burmolle M *et al.* (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent. *Microbiology*, **151**(2): 373 -383]
- [Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ *et al.* (2008) Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Rep. Reg.* **16** (1): 2- 10]
- [Bosset S, Sauret V, Cousin F, Vincent L, Pacheco Y, Nicolas JF (2000) Perspectives thérapeutiques dans la dermatite atopique. *La dermatite atopique*. Crickx, Lamirand et Nicolas Editeurs. Paris. 141-151]
- [Brady RA, Leid JG, Calhoun JH *et al.* (2008) Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**: 13- 22]
- [Branda SS, Gonzalez- Pastor JE, Ben- Yehuda S *et al.* (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11621- 11626]
- [Buraczewska I, Berne B, Lindberg M, Törmä H, Loden M (2007) Changes in skin barrier function following long-term treatment with moisturizers, a randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology*. **156**: 492-498]
- [Burkhart (2003) Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. *International Journal of Dermatology*. **42**: 925-927]
- [Burmolle M, Webb JS *et al.* (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 3916-3923]
- [Bury- Moné S. (2007) *Les biofilms*. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.]

- [Carmen JC, Roeder BL, Nelson JL *et al.* (2005) Treatment of biofilm infections on implants with low frequency ultrasounds and antibiotics. *Am. J. Infect. Control.* **33**: 78- 82]
- [Castonguay MH, Van der Schaaf S, Koester W *et al.* (2006) Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co- adhesion mechanisms with adherence- proficient bacteria. *Res. Microbiol.*, **157**: 471- 478]
- [Characklis WG (1973) Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res.* **7**, 1249-1258]
- [Characklis WG, Marshall KC (1990 a) *Biofilms*, 195-231]
- [Characklis WG, Marshall KC (1990 b) *Biofilms*, 341-394]
- [Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ (2001) Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **6**(3): 170-174]
- [Clutterbuck AL, Woods EJ, *et al.* (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.*, Mar 31; **121** (1-2): 1-17]
- [Cochran WL, Suh SJ, McFeters GA *et al.* (2000) Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 546-553]
- [Conley J, Olson ME *et al.* (2003) Biofilm formation by group A Streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J. Clin. Microbiol.* 4043-4048]
- [Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978) How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**: 86-95]
- [Costerton JW, Stewart PS *et al.* (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318-1322]
- [Costerton JW (2004) A short history of the development of the biofilm concept. Methods of studying biofilms. Ghannoum M & O'Toole GA Editors. *Microbial biofilms*, ASM Press, 4-19]
- [Cotter PA, Stibitz S (2007) c- di- GMP- mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 17-23]

[Donlan RM (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 277-281]

[Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8** (9), 881-890]

[Donlan RM (2008) Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 133-161]

[Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**: 167- 193]

[Donlan RM, Pipes WO, Yohe TL (1994) Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. *Water. Res.*, **28** : 1497-1503].

[Doolittle MM, Cooney JJ, Caldwell DE (1995) Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4. *Can. J. Microbiol.* **41**: 12-18]

[Drenkard E (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* **5**: 1213-1219]

[Drenkard E, Ausubel FM (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature.* **416**: 740-743]

[Emori TG, Gaynes RP (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **6** : 428-442]

[Feingold DS (1986) Bacterial adherence, colonization, and pathogenicity. *Arch. Dermatol.* **122**: 161-163]

[Fletcher M (1988) Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *J. Bacteriol.*, **170**: 2027-2030]

[Francey T, Gaschen F, Nicolet J *et al.* (2000) The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *J. Vet. Intern. Med.* **14**: 177-183]

- [Garcia- Saenz MC, Arias-Puente A, Fresnadillo- Martinez MJ & Matilla- Rodriguez A (2000) In vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **26**: 1673- 1679]
- [Gilbert P, McBain AJ (2001) Biocide usage in the domestic setting and concern about antibacterial and antibiotic resistance. *J. Infect.* **43**: 85-91]
- [Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C *et al.* (2005) Characterization of starvation- induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.*, **7**: 894- 906]
- [Gjødtsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T *et al.* (2006) Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int. Wound. J.* **1**: 1-2]
- [Goller CC, Romeo T (2008) Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 37- 66]
- [Golovlev EL (2002) The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. *Mikrobiologija* **71**: 293-300]
- [Hafték M (2001) Couche cornée et désquamation. *Biologie cutanée*. 5<sup>e</sup> cours spécialisé du GEDAC]
- [Hafték M (2003) Données structurales et ultrastructurales sur les lipides cutanés humains. Colloque sur les lipides de la peau. *Pathologie Biologie.* **51** : 264-266]
- [Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(2): 95-108]
- [Hatt JK, Rather PN (2008) Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 163- 192]
- [Henrici AT (1933) Studies of Freshwater Bacteria: A Direct Microscopic Technique. *J. Bacteriol.* **25**: 277-286]
- [Hentges DJ (1993) The anaerobic microflora of the human body. *Clin. Infect. Dis.* **16** : 175- 180]
- [Hinnebusch BJ, Erickson DL (2008) *Yersinia pestis* in the flea vector and its role in the transmission of the plague. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 229- 248]

- [Humbert P (2003) Conséquences fonctionnelles des perturbations des lipides cutanés. Colloque sur les lipides de la peau. *Pathologie Biologie*. **51** : 271-274]
- [Irie Y, Parsek MR (2008) Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 67- 84]
- [Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T (2006) Staphylococcal cutaneous infections : Invasion, evasion and aggression. *J. Dermatol. Sci.* **42**: 203-214]
- [Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT *et al.* (2008) Complicated catheter- associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, (21) **1**:26-59]
- [Jarrett CO, Deak E, Isherwood KE *et al.* (2004) Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J. Infect. Dis.* **190**: 783- 792]
- [Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ *et al.* (2001) Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet*, **357**: 40- 41]
- [Karchmer AW, Gibbons GW (1994) Infections of prosthetic heart valves and vascular grafts. In. Bisno AL, Waldvogel FA, Editors. *Infections associated with indwelling medical devices*. 2<sup>nd</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology; 213-249]
- [Klevins RM, Tokars JJ, Andrus M (2005) *Nephrol. News Issues* **19**: 37- 38, 43]
- [Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC *et al.* (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 1- 16]
- [Lasa I, Penades JR (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* **157**: 99- 107]
- [Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME *et al.* (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma- mediated macrophage killing. *J.Immunol.* **175**: 7512-7518]
- [Lewis K (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**: 999-1007]
- [Lewis K (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 107- 131]

[Llyod DH, Garthwaite G (1982) Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Res. Vet. Sci.* 33-99]

[Macfarlane S, Dillon JF (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 2007, **102** (5): 1187- 1196]

[MacLean RJC, Bates CL, Barnes MB *et al.* (2004) Methods of studying biofilms. Ghannoum M & O'Toole GA Editors. *Microbial biofilms*, ASM Press, 379-413]

[Mah TL, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**: 34- 39]

[Mah TF, Pellock B, Walker GC (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, **426**: 306- 310]

[Maki DG (1994) Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention and management. In: Bisno AL, Waldvogel FA, Editors. *Infections associated with indwelling medical devices*. 2<sup>nd</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology; 155-212]

[Marples MJ (1969) The normal flora of the human skin. *Brit. J. Derm.* **81** (suppl 1): 2-13]

[Marr KA, Sexton DJ, Conlon PJ *et al.* (1997) Catheter- related bacteremia and outcome of attempted catheter salvage in patients undergoing hemodialysis. *Ann. Inter. Med.* **127**: 275-280]

[Martinez LR, Casadevall A (2007) *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4592- 4601]

[Martini MC (2006) Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. Deuxième Edition. Editions Tec et Doc Lavoisier]

[Masako K, Hideyuki I, Shigeyuki O, Zenro I (2005) A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *Journal of Dermatological Science*, **38**: 197- 205]

- [Matousek JL, Campbell KL (2002) A comparative review of cutaneous pH. *Vet. Dermatol.* **13** (6): 293-300]
- [Maury E, Julié S, Charvéron M, Gall Y, Chap H (2003) Lipides et inflammation cutanée: place des phospholipases A2. Colloque sur les lipides de la peau. *Pathologie Biologie.* **51** : 248-252]
- [Messing B, Peitra- Cohen S, Debure A *et al.* (1988) Antibiotic-lock technique: a new approach to optimal therapy for catheter- related sepsis in home-parenteral nutrition patients. *JPEN J. Paren. Enteral. Nutrit.* **12**: 185- 189]
- [Meyer W, Neurand K (1991) Comparison of skin pH in domesticated and laboratory animals. *Archives of Dermatological Research.* **283** : 16-18]
- [Mialot M (1993) Histologie de la peau normale. *Encyclopédie vétérinaire.* Dermatologie 0100. 8 p.]
- [Mittelman MW (1996) Adhesion to biomaterials. *Bacterial Adhesion : molecular and ecological diversity*, 89- 127]
- [Monzon M, Oteiza C, Leiva J (2002) Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diag. Microbiol. Infect. Dis* **44**: 319- 324]
- [Muller J, Miller MC, Nielsen AT *et al.* (2007) vpsA- and luxO- independent biofilms of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **275**: 199- 206]
- [Nielsen AT, Dolganov NA, Otto G *et al.* (2006) RpoS controls the *Vibrio cholerae* mucosal escape response. *PLoS Pathog.* 2 (10): e109]
- [Nielsen ML, Raahave D, Stage JG, Justesen T (1975) Anaerobic and aerobic skin bacteria before and after skin-disinfection with chlorhexidine: An experimental study in volunteers. *J. Clin. Path.* **28** : 793-797]
- [Olivry T, Müller RS, Walder EJ, Atlee BA (1993) Anatomie et physiologie microscopiques de la peau. *Encyclopédie Vétérinaire.* Dermatologie 200. 13 p]
- [O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**: 49- 79]

- [O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304]:
- [Otto M (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 207- 228]
- [Parsek MR, Fuqua C (2004) Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface- associated microbial life. *J. Bacteriol.*, **186**: 4427-4440]
- [Patel R (2005) Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 41-47]
- [Patti JM, Allen BL, McGavin MJ *et al.* (1994) MSCRAMM- mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**: 585-617]
- [Percival SL, Bowler PG (2004 a) Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 16, 234-240]
- [Percival SL, Bowler PG (2004 b) Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. *World Wide Wounds*]
- [Popa I, Schmitt D, Portoukalian J (2007) Lipides épidermiques et vieillissement cutané. *Actualités en Biologie Cutanée.* **1** : 158-162]
- [Presterl E, Suchomel M, Eder M, Reichman S, Lassnigg A, Graninger W & Rotter M (2007) Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**: 417-420]
- [Prigent- Combaret C, Vidal O, Dorel C *et al.* (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5993-6002]
- [Queck S-Y, Weitere M, Moreno AM *et al.* (2006) The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol.*, **8**: 1017- 1025]
- [Raad I, Costerton W, Sabharwal U *et al.* (1993) Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J.Infect.Dis* **168**: 400-407]
- [Reedy LM, Miller WH, Willemse T (1997) Allergic skin diseases of dogs and cats. 2nd edition. Saunders, Philadelphia, USA. p.41]

- [Sailer FC, Meberg BM, Young KD (2003) Beta-lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **226**: 245- 249]
- [Sauer K, Camper *et al.* (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during developing a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140-1154].
- [Sauer K, Culen MC, Rickard AH *et al.* (2004) Characterization of nutrient- induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.*, **186** (21): 7312- 7326]
- [Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* **48**: 253- 267]
- [Scott, Miller, Griffin (2001) Structure and function of the skin. *Müller & Kirk's Small Animal Dermatology*. Sixth Edition. WB Saunder Company. **1**: 1-70]
- [Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007) Dental caries. *The lancet*, **369**: 51-59]
- [Sers EL (1984) Contribution à l'étude du pH cutané du chien. Thèse Med. Vet.]
- [Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP *et al.* (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**:552-555]
- [Skillman LC, Sutherland IW, Jones MV (1999) The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J.Appl.Microbiol. Symp. Suppl.* **85**:13S-18S]
- [Smith E, 2001, Com. Pers. À Marignac G]
- [Spormann AM (2008) Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 17- 36]
- [Stewart PS (2003) Diffusion in biofilms. *J. Bacteriol.*, **185**:1485-1491]
- [Stickler DJ (1996) Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling* **94**: 293-305]
- [Stickler DJ (2002) Susceptibility of antibiotic resistant Gram-negative bacteria to bacteriocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Symp. Ser. Appl. Microbiol.* **31**: 163S- 170S]

- [Stoodley P, Boyle JD, Dodds I *et al.* (1997) *Biofilms : community interactions and control*, 1-9]
- [Sutherland I (2001) Biofilm exopolysaccharide: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**: 3-9]
- [Teng YT (2003) The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **14**: 237-252]
- [Tenke P, Kovacs B, Jackel M *et al.* (2006) The role of biofilm infection in urology. *World J. Urol.* **24**: 13-20]
- [Thormann KM, Duttler SA, Saville R *et al.* (2006) Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic-di-GMP. *J. Bacteriol.*, **188**(7): 2681- 2691]
- [Tizon C (2006) Etude dans l'espèce canine, des principaux paramètres physiologiques de la surface cutanée : sébométrie, cornéométrie, TEWL et pH. Thèse Med.Vet. Nantes. 58. 88p.]
- [Tolker- Nielsen T., Molin S (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.*, **40**: 75-84]
- [Toma B, André- Fontaine G, Artois M *et al.* (2007) *Les zoonoses infectieuses*, 170- 173]
- [Tomlin KL, Malott RJ *et al.* (2005) Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208- 5218]
- [Tunney MM, Jones DS, Gorman SP *et al.* (1999) Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. Doyle editor, *Methods Enzymol.*, **310**: 558-566]
- [Utili R, Durante-Mangoni E, Tripodi MF (2007) Infection of intravascular prostheses: how to treat other than surgery. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30** S: S42- S50]
- [Van Houdt R, Michiels C (2005) Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.*, **156**: 626-633]
- [Vanechoutte M, Devriese LA *et al.* (2000) *Acinetobacter baumannii* –infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4280-4281]

[Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C *et al.* (1998) Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces : involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* **180**: 2442- 2449].

[Wang X, Preston JF 3rd, Romeo T (2004) The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**: 2724- 2734]

[Wanner O, Bauchrowitz M (2006) Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News* **60 f**: 4-7]

[Whiteley M, Bangera & al. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, **413** :860-864]

[Wolfe AJ, Chang DE, Walker JD *et al.* (2003) Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol. Microbiol.*, **48**: 977- 988]

[Wolff K, Johnson RA, Suurmond D (2005) Dermatite atopique. *Fitzpatrick. Atlas en couleurs de dermatologie clinique*. Editions Médecine- Sciences Flammarion. 33-38]

[Zabinski RA, Walker KJ, Larsson AJ *et al.* (1995) Effects of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 507-512]

[Zegans ME, Becker HI, Budzik J & O'Toole G (2002) The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA and Cell Biology*, **21**: 415-420].

## **SITES INTERNET :**

\*Université de l'Etat de Montana. *Site de l'Université de l'Etat de Montana, Center for Biofilm engineering*. [<http://www.biofilm.montana.edu>]. Consulté le 22 Mars 2009

\*<http://www.techno-science.net> , site consulté le 29 Avril 2009, dernière mise à jour le 30 Avril 2009

\*<http://www.jouy.inra.fr>, site consulté le 29 Avril 2009, dernière mise à jour le 28 Juillet 1998

## **Annexe : Article de synthèse**

**Auteurs : A d R, HJ B et G M**

Most of the micro-organisms do not exist in natural environment as plankton nor as free-floating micro-organisms in suspension, but as biofilms (Costerton 1995), (Donlan & Costerton, 2002). Biofilms are sessile communities of micro-organisms associated with a surface, and encased in a self-produced extracellular matrix (Costerton, 1999), (Beloin, 2008). This lifestyle is associated with numerous changes such as an inherent resistance to antimicrobial agents that makes them responsible for many persistent and chronic bacterial infections. Biofilms may form on a wide variety of surfaces, ranging from living tissues, indwelling medical devices, river rocks to industrial water system piping, ship hulls (Spormann, 2008) ... The interface between a solid surface and an aqueous medium, such as water or blood for example, provides an ideal environment for the attachment of micro-organisms and biofilm formation (Donlan, 2002).

Biofilms are a threat for public health because of their role in chronic infectious diseases and many nosocomial and device-related infections (Donlan, 2001), (Clutterbuck, 2007). As much as 65% of all infections in developed countries are caused by biofilms, such as cystic fibrosis, otitis media, dermatoses, periodontitis, native valve endocarditis, nosocomial infections and device-related infections (Costerton, 1999), (Hall- Stoodley, 2004)...

Since the 1990's, the study of biofilm has been greatly improved by the development of new techniques such as scanning laser microscopy coupled with fluorescent markers (Donlan, 2002). This has led to a large number of publications mainly focusing in finding ways of controlling biofilms during infections or using them in various applications.

The aim of this article is to review the main features of biofilm physiology and medical involvement, and to see how this knowledge could be relevant in dermatology.

Although every microbial biofilm community is unique, some structural characteristics can be considered descriptive of biofilms in general (Stoodley, 1997), (Tolker-Nielsen, 2000). The conceptual model of a biofilm includes a thin base film, ranging from a monolayer of cells to a film several layers thick. These layers are organized in a concentric manner and connected by water channels. This layered organization explains the gradients of nutrients and oxygen concentrations and in growth rates within the biofilm.

Biofilm formation is a complex process regulated by numerous factors, further complicated by the different needs that each micro-organisms community displays (Donlan, 2002), (Martinez & Casadevall, 2007). Physical properties of the surface (roughness, hydrophobicity, hydrophilicity) have a major effect on the binding of micro-organisms. Therefore, it is not surprising that solid surfaces and, to a lesser extent, presence of an interface, facilitate the initiation of biofilm. Another facilitator is the presence of a conditioning film. It forms and coats a substratum when proteins are adsorbed by it; this coat modifies the surface's properties and influence bacterial attachment (Goller & Romeo, 2008). Corneocytes, which are found in the stratum corneum of the skin, are a support for biofilm

formation, as the skin is an intricate habitat for many bacteria and fungi. The persistent bacterial colonization of the skin results from the ability of bacteria to adhere to skin epithelium, to grow in an acidic and dry milieu and to quickly re-adhere during the normal process of desquamation (Feingold, 1986). Biofilms formed on the skin are most of the time part of the healthy skin commensal microflora, but may be also responsible for dermatoses, such as acne, atopic dermatitis or suppurative bacterial otitis media. Some characteristics of cutaneous cells, such as adhesion molecules (e.g fimbriae or flagella) or cell hydrophobicity influence the binding of micro-organisms (Beloin, 2008), (Goller & Romeo, 2008), (Donlan, 2002).

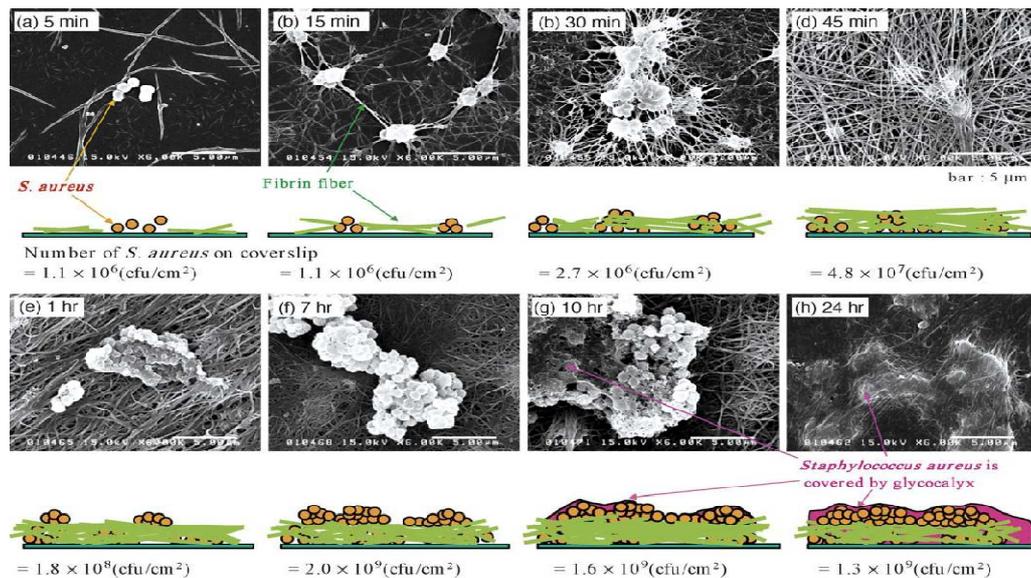
Growth medium characteristics such as hydrodynamic properties, nutrient and oxygen concentrations, pH and temperature, have major impacts on biofilm development (Goller & Romeo, 2008), (Clutterbuck, 2007). Once established, biofilm growth is also regulated by a cell-to-cell signaling mechanism called quorum sensing. It regulates cellular processes in a cell density-dependent manner (Irie & Parsek, 2008), (Tomlin & al, 2005).

The life-cycle of a biofilm involves the transition from individual free-swimming cells to bacterial sessile communities, followed by a subsequent return to a planktonic existence. It is divided in five stages : (1) reversible (adherence) and (2) irreversible (adhesion) attachment to the surface to detachment, (3) biofilm growth, (4) biofilm maturation (Clutterbuck, 2007). Then, sessile biofilm communities can give rise to (5) planktonic bacteria that can rapidly multiply and disperse. For example, a *Staphylococcus aureus* biofilm can form on the skin within 24 hours. Actually, *Staphylococcus aureus* is rarely found on healthy skin, but it can be isolated from the skin microflora of patients with dry atopic dermatitis. There is a positive correlation between the skin lesions of atopic dermatitis patients and the number of biofilms of *Staphylococcus aureus* (Masako, 2005). Biofilms of *Staphylococcus aureus* are composed of fibrin fiber and of glycocalyx. Fibrin fibers appear at the earlier stage of the biofilm formation (Figure 1). Then, the bacteria are surrounded by a scaffold made of fibrin fibers within 7 hours. Finally, bacteria secrete glycocalyx; the biofilm matures within 3 days.

**Figure 1: Time course of *Staphylococcus aureus* biofilm formation.**

(Masako, 2005), with permission

After 5 minutes of incubation, fibrin fibers appear around the bacteria (a), (b) & (c). After 45 minutes, the surroundings of bacteria are covered with a fibrin net (d). After 7 hours, the number of bacteria increases, using the net of fibrin as a scaffold (e) & (f). Then, the bacteria release glycocalyx around their bodies. The biofilm forms within 24 hours (h) and is completely mature 3 days later.

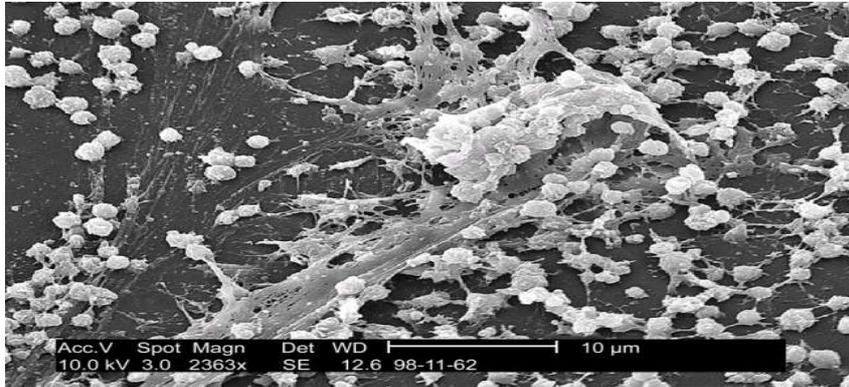


Biofilm architecture is heterogeneous both in space and time (Donlan, 2002). In natural conditions, most biofilms, especially those found on the skin, are composed of mixture of micro-organisms and monospecific biofilms are quite rare (Sutherland, 2001), (Burmolle & al, 2006). Matrix components vary from one biofilm to another. The biofilm structure also depends on the nutritive characteristics of the environment and of the type of support (Donlan, 2002). Then, the thickness of a biofilm grows as the biofilm ages. Actually, the exact structure of any biofilm is strongly related to the unique features of the environment in which it develops, as it is remodeled constantly under the influence of external and internal processes (Clutterbuck, 2007).

Biofilm architecture could be defined as heterogeneous mosaics, with a mushroom or coralian appearance (Figure 2), and penetrated by water channels (Costerton, 1999). This architecture allows communication and cooperation between microorganisms within the biofilm, consistent with a true ecosystem (Burmolle & al, 2006), (Donlan, 2002).

**Figure 2: Scanning electron micrograph of a *Staphylococcus* biofilm on the inner surface of an indwelling medical device (needleless connector).**

Photograph by Janice Car, Public Health Image Library Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA, with permission.



Growth within a biofilm is associated with numerous genetic and phenotypic changes. Biofilms constitute a protected mode of growth, allowing survival in adverse environmental conditions. The transition between these planktonic and biofilm ways of life involves important genes regulation and major phenotypic changes. Biofilms associated micro-organisms produce an extracellular matrix made of exopolysaccharides, extracellular DNA, excreted cellular products and water, which is the major component : up to 97% (Sutherland, 2001). This matrix acts as a protective exoskeleton, serving as a physical barrier against desiccation, antimicrobial agents and antibiotic treatment (Clutterbuck, 2007), (Burmolle & al, 2006). Nevertheless, matrix role is not fully understood yet (Beloin 2008). Biofilm-associated cells are characterized by reduced growth rates and up and down- regulation of specific genes. The most significant change remains increased resistance to antibiotic therapy (Anderson & O'Toole, 2008). Actually, micro-organisms within a biofilm are 10 to 1000-fold more resistant to antibiotic therapy than their planktonic counterparts (Mah & O'Toole, 2001). That could explain, at least partly, the difficulty to treat many dermatoses caused or aggravated by biofilms, such as atopic dermatitis (biofilms of *Staphylococcus aureus*), acne (biofilms of *Propionibacterium acnes*) or suppurative bacterial otitis media.

Antibiotic therapy is the most commonly used way to treat micro-organisms multiplication in Dermatology. Relapses or chronic evolution are common and are usually imputed to the presence of an underlying cause such as allergy, endocrine disorder or genetic predisposition, and/or microbial resistance. It is most of the time inefficient, regarding the inherent resistance of bacterial biofilms and the increasing number of antibiotic-resistant strains. Moreover, antibiotics and germicides are not the best choice to remove pathogenic bacteria from the skin, because of their irritating properties (Masako, 2005). They also remove bacteria from the normal skin microflora: the skin micro-flora balance is broken. The benefic micro-organisms, that should have protected the skin from a pathogenic bacterial

contamination, have been removed. Thus, the skin has no physical barrier against pathogenic micro-organisms anymore and pathogenic bacteria can invade. Actually, commensal bacteria protect the host from pathogenic bacteria both directly and indirectly. Direct effects include for example bacteriocin production, production of toxic metabolites or prevention of adherence of competing bacteria... Indirectly, bacteria can induce the host to stimulate phagocytose or to enhance antibody production (Chiller, 2001). For example, *Staphylococcus epidermidis*, which is an normal inhabitant of the skin micro-flora, can prevent *Staphylococcus aureus* from adherence and biofilm formation on the skin by competitive binding of keratinocyte receptors (Bibel, 1983).

Another way of eradicate biofilms on the skin is topical treatment. On the one hand, the interest of topical treatment compared to systemic treatment is that, at least in some dermatological cases, the administered molecule directly access the vascularity of the dermis and can be effective. On the other hand, topical treatment directly acts on the biofilm structure and is more effective than systemic antibiotic therapy. Thus, the best way to fight against biofilms formed on the skin, and responsible for dermatoses, is to eradicate them by mechanical removal and by using local bactericide agents. For example, hydrogen peroxide at a concentration of 3% and 5%, and alcohols quickly eradicate *Staphylococcus epidermidis* biofilms, whereas povidone-iodine is less effective (Presterl, 2007). But the application of these results has limitations, considering that those molecules remain toxic and irritative for skin and tissues, if used for longer contact times. Many studies are lead, in order to find and implement novel therapeutic strategies and effective control measures.

To conclude, it is quite difficult to treat dermatoses caused by biofilms, as it is not easy to differentially attack micro-organisms of the skin micro-flora and micro-organisms responsible for dermatoses, since their sensitivity to many drugs are similar (Masako, 2005). For example, biofilms of *Staphylococcus aureus* from atopic dermatitis patients could be removed with the synergistical use of xylitol and farnesol, associated within a cream. Actually, the minimum inhibitory concentration of farnesol for *Staphylococcus aureus* is lower than that for *Staphylococcus epidermidis*; so, farnesol inhibits the growth of *Staphylococcus aureus* only (Masako, 2005).

The involvement of biofilms in human and animal dermatoses is very significant. The main consequences for topical prescription in everyday dermatological practice is to try to respect the physiological balance of the skin microflora, in order to prevent from any disruption of the skin bacterial homeostasis. It is a difficult challenge, regarding the limited data available. Actually, much remains to be done.

## References

- [Anderson GG, O'Toole GA (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 85-105]
- [Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008) Escherichia coli biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 249- 289]
- [Bibel DJ, Aly R, Shinefield HR, Maibach HI (1983) The *Staphylococcus aureus* receptor for fibronectin. *J. Invest. Dermatol.* **80**: 494-496]
- [Burkhart (2003) Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. *International Journal of Dermatology.* 42: 925-927]
- [Burmolle M, Webb JS & al (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental Microbiology*, 3916-3923]
- [Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ (2001) Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 6(3): 170-174]
- [Clutterbuck AL, Woods E J, & al (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.*, Mar 31; **121** (1-2): 1-17]
- [Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745]
- [Costerton JW, Stewart PS & al. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318-1322]
- [Donlan RM (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 277-281]
- [Donlan RM (2002) Biofilms : Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8** (9), 881-890]
- [Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15** : 167- 193]
- [Feingold DS (1986) Bacterial adherence, colonization, and pathogenicity. *Arch. Dermatol.* **122**: 161-163]
- [Goller CC, Romeo T (2008) Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 37- 66]
- [Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(2): 95-108]

- [Irie Y, Parsek MR (2008) Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 67- 84]
- [Mah TL, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**: 34- 39]
- [Martinez LR, Casadevall A (2007) *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 4592- 4601]
- [Masako K, Hideyuki I, Shigeyuki O, Zenro I (2005) A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *Journal of Dermatological Science*, **38**: 197- 205]
- [O'Gara J, Humphreys H (2001) Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* **50**: 582-587]
- [Presterl E, Suchomel M, Eder M, Reichman S, Lassnigg A, Graninger W & Rotter M (2007) Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of Staphylococcus epidermidis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **60**: 417-420]
- [Spormann AM (2008) Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 17- 36]
- [Stoodley P, Boyle JD, Dodds I & al.(1997) *Biofilms : community interactions and control*, 1-9]
- [Sutherland I (2001) Biofilm exopolysaccharide : a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**: 3-9]
- [Tolker- Nielsen T, Molin S (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.*, **40**: 75-84]
- [Tomlin KL, Malott RJ et al. (2005) Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 5208- 5218]



# LES BIOFILMS ET LA PEAU

De CHALVET de ROCHEMONTEIX Alice

## Résumé :

Un biofilm est une **communauté de micro-organismes** (bactéries, champignons, protozoaires ou algues) adhérant entre eux et fixés à une surface. Ils sont enrobés dans une matrice d'exopolysaccharides protectrice et adhésive qu'ils synthétisent. Le mode de vie en biofilm est le **mode de comportement prédominant** des organismes unicellulaires, et non la flottaison libre de type dit "planctonique". Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe, caractérisé par un **changement radical de phénotype** et par l'acquisition de propriétés spécifiques aux biofilms, notamment l'acquisition d'une **antibiorésistance**. Ceci pose de graves problèmes de santé publique: les biofilms peuvent se former sur des implants médicaux et être à l'origine d'**infections nosocomiales**. On trouve aussi des biofilms à la surface de la peau : ces derniers sont impliqués dans les phénomènes de cicatrisation, d'homéostasie cutanée et dans le développement de dermatoses. Le but de cette étude bibliographique est de proposer des axes de recherche sur la problématique des biofilms en dermatologie et d'aboutir à l'élaboration de principes fondamentaux permettant une prescription cohérente et raisonnée de topiques dans le cadre d'une consultation de dermatologie humaine ou vétérinaire.

## Mots-clefs :

**BIOFILMS/**

**INFECTIONS**

**NOSOCOMIALES/DERMATOLOGIE/PEAU/BACTERIES/ANTIBIORESISTANCE/  
HOMME/CARNIVORES/CHIEN.**

## Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr Marniac Geneviève

Assesseur : Pr Boulouis Henri- Jean

Invité : Dr Hubert Blaise

## Adresse de l'auteur :

Mademoiselle de Chalvet de Rochemonteix Alice, 14 avenue de la Sœur Rosalie, 75013 Paris.

# **LES BIOFILMS ET LA PEAU**

**De CHALVET de ROCHEMONTEIX Alice**

## **Summary:**

Biofilms are sessile communities of micro-organisms (bacteria, fungi, protozoa or algae) associated with a surface, and encased in a self-produced extracellular matrix of exopolysaccharides. It is the predominant way of life of unicellular organisms. The other alternative is the free-floating type, known as “planktonik”. The change from one lifestyle to another is a dynamic and complex process, characterized by phenotypic changes and acquisition of properties specific to biofilms, such as antibiotic resistance. This can lead to serious public health problems because biofilms can form on medical devices and cause nosocomial infections. There are also biofilms on the skin: they are involved in numerous phenomena such as healing, skin homeostasis and dermatoses. The aim of this bibliographic review is to consider the involvement of biofilms in human and animal dermatoses and the consequences for topical prescription in everyday dermatological practice.

## **Keywords:**

**BIOFILMS/**

**NOSOCOMIAL INFECTIONS/DERMATOLOGY/SKIN/BACTERIA/ANTIBIOTIC**

**RESISTANCE/HUMAN/DOG/CARNIVORES.**

## **Jury:**

President: Pr.

Director: Dr Marignac Geneviève

Assessor: Pr. Boulouis Henri- Jean

Guest: Dr. Hubert Blaise

## **Author's address:**

Ms. De Chalvet de Rochemonteix Alice, 14 avenue de la Sœur Rosalie, 75013 Paris.