



Université de Strasbourg  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**

N°ordre .....

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

-

DÉTECTION ET ÉLIMINATION DES BIOFILMS  
DANS LES INDUSTRIES PHARMACEUTIQUES :  
FOCUS SUR LES CIRCUITS D'EAU

Présenté par Solène JOERG

Soutenu le 28 novembre 2023 devant le jury constitué de

Pr. Julien GODET, Président

Dr. Patrice RASSAM, Directeur de thèse

Dr. Gaëlle MEYER, Autres membres du jury

Approuvé par le Doyen et  
par le Président de l'Université de Strasbourg



<b>Doyen</b>	Esther KELLENBERGER
<b>Directeurs adjoints</b>	Julien GODET Béatrice HEURTAULT Emilie SICK
<b>Directeur adjoint étudiant</b>	Léo FERREIRA-MOURIAUX

### LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

#### Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Line	BOUREL	Chimie thérapeutique
Pascal	DIDIER	Biophotonique
Saïd	ENNAHAR	Chimie analytique
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Philippe	GEORGEL	Bactériologie, Virologie
Jean-Pierre	GIES	Pharmacologie moléculaire
Béatrice	HEURTAULT	Pharmacie galénique
Esther	KELLENBERGER	Bio-Informatique
Maxime	LEHMANN	Biologie cellulaire
Eric	MARCHIONI	Chimie analytique
François	MEGERLIN	Droit et économie pharm.
Yves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	PABST	Droit Economie pharm.
Françoise	PONS	Toxicologie
Valérie	SCHINI-KERTH	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biogalénique
Catherine	VONTHRON	Pharmacognosie
Pascal	WEHRLÉ	Pharmacie galénique

#### Professeurs-praticiens hospitaliers

Julien	GODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESSINGER	Biochimie
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline	SOULAS-SPRAUEL	Immunologie
Geneviève	UBEAUD-SÉQUIER	Pharmacocinétique

#### Enseignants contractuels

Alexandra	CHAMPERT	Pharmacie d'officine
Matthieu	FOHRER	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAIS	Droit et économie pharm.
Philippe	NANDE	Ingénierie pharmaceutique
Caroline	WILLER - WEHRLÉ	Pharmacie d'officine

#### Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie biogalénique
Fareeha	BATOOL	Biochimie
Martine	BERGAENTZLÉ	Chimie analytique
Elisa	BOMBARDA	Biophysique
Aurélié	BOURDERIOUX	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CASSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela	CHIPER	Pharmacie biogalénique
Guillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Marcella	DE GIORGI	Pharmacochimie
Serge	DUMONT	Biologie cellulaire
Gisèle	HAAN-ARCHIPOFF	Plantes médicinales
Célien	JACQUEMARD	Chémoinformatique
Julie	KARPENKO	Pharmacochimie
Sonia	LORDEL	Chimie analytique
Clarisse	MAECHLING	Chimie physique
Rachel	MATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Cherifa	MEHADJI	Chimie
Nathalie	NIEDERHOFFER	Pharmacologie
Sergio	ORTIZ AGUIRRE	Pharmacognosie
Sylvie	PERROTEY	Parasitologie
Romain	PERTSCHI	Chimie en flux
Frédéric	PRZYBILLA	Biostatistiques
Patrice	RASSAM	Microbiologie
Eléonore	REAL	Biochimie
Andreas	REISCH	Biophysique
Ludivine	RIFFAULT-VALOIS	Analyse du médicament
Carole	RONZANI	Toxicologie
Emilie	SICK	Pharmacologie
Yaouba	SOUAIBOU	Pharmacognosie
Maria-Vittoria	SPANEDDA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TERRAND	Physiopathologie
Nassera	TOUNSI	Chimie physique
Aurélié	URBAIN	Pharmacognosie
Bruno	VAN OVERLOOP	Physiologie
Maria	ZENIOU	Chimiogénomique

#### Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ÉTIENNE-SELLOUM	Pharmacologie- pharm. clinique

#### Assistant hospitalier universitaire

Damien	REITA	Biochimie
--------	-------	-----------

# SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,  
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens  
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit  
dans les préceptes de mon art et de  
leur témoigner ma reconnaissance en  
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,  
ma profession avec conscience et de respecter non  
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles  
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets  
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu  
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,  
que je sois moi-même honoré  
et estimé de mes confrères  
et de mes patients.



## Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury. Je vous remercie pour le temps passé à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Patrice Rassam d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci de votre disponibilité, de votre aide et de votre soutien tout le long de cet exercice.

Je remercie également le Professeur Julien Godet, d'avoir accepté de présider le jury et le Docteur Gaëlle Meyer, d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Un grand merci aux personnes ayant pris le temps de répondre à mon enquête terrain, qui sans elles, n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie l'ensemble des professeurs de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg pour tous les enseignements et connaissances apportés durant ces 6 années d'études.

Un énorme merci à mes amies de la fac ; Colyne, Daisy et Lucile pour leur aide et soutien durant toute l'année.

Enfin, un immense merci à ma famille de m'avoir soutenue durant toutes ces années.

## Table des matières

<b>Liste des abréviations et significations.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des figures et des tableaux .....</b>	<b>8</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>1. L'eau .....</b>	<b>10</b>
a. Eau potable.....	11
b. Eau purifiée.....	12
b.1 Eau purifiée vrac .....	16
b.2 Eau purifiée conditionnée en récipients .....	17
c. Eau pour préparations injectables (eau ppi).....	19
c.1 Eau pour préparations injectables en vrac.....	21
c.2 Eau stérilisée pour préparations injectables .....	21
<b>2. Les biofilms .....</b>	<b>23</b>
a. Formation du biofilm .....	23
b. Rôle du biofilm dans l'écosystème microbien.....	24
<b>II. Détection des biofilms.....</b>	<b>25</b>
<b>1. Contrôle de l'eau.....</b>	<b>26</b>
A. Mesure du COT (carbone organique total) .....	26
B. Mesure de la conductivité .....	27
C. Mesure des endotoxines.....	27
D. Dénombrement sur gélose.....	29
<b>2. Cytométrie en flux .....</b>	<b>30</b>
<b>3. ATP-métrie.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Ultrasons.....</b>	<b>32</b>
<b>5. Microscopies.....</b>	<b>33</b>

<b>III.</b>	<b>Élimination des biofilms.....</b>	<b>36</b>
1.	Ozone .....	36
2.	Peroxyde d'hydrogène.....	36
3.	Acide peracétique .....	36
4.	Composés chlorés.....	36
5.	Ultraviolets (UV).....	37
6.	Méthode enzymatique .....	38
7.	Perturbation du flux d'eau .....	38
<b>IV.</b>	<b>Questionnaire : expériences de terrain ; détection et élimination des biofilms .....</b>	<b>39</b>
1.	Matériel et méthode.....	39
A.	Objectif .....	39
B.	Champ d'application .....	39
C.	Recueil des réponses .....	39
2.	Résultats .....	39
A.	Partie 1 : détection des biofilms.....	39
B.	Partie 2 : élimination des biofilms .....	42
<b>V.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>44</b>
1.	Détection des biofilms.....	44
2.	Élimination des biofilms.....	45
3.	Implication de ce mémoire pour les pharmaciens .....	47
<b>VI.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>50</b>
<b>VII.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>52</b>
<b>VIII.</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>60</b>
	Annexe 1 : Résultats du questionnaire.....	60

## Liste des abréviations et significations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARS : Agence Régionale de Santé

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

COT : Carbone Organique Total

DGAT : Dénombrements des Germes Aérobieux Totaux

EDCH : Eaux Destinées à la Consommation Humaine

EPS : Exopolysaccharide

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

LPS : Lipopolysaccharide

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

R2A : Reasoner's 2 Agar

ROS : Reactive Oxygen Species : espèces réactives de l'oxygène

UNICEF : United Nations International Children's Emergency Fund : Fonds des Nations unies pour l'enfance

UV : Ultraviolet

VBNC : Viable But Non Culturable : viable mais non cultivable

ZAC : Zones à Atmosphère Contrôlée

## Liste des figures et des tableaux

<i>Figure 1 : Principe du traitement de l'eau brute en eau potable</i>	12
<i>Figure 2 : Principe simplifié du processus de distillation</i>	13
<i>Figure 3 : Principe de l'adoucissement</i>	14
<i>Figure 4 : Principe de la déminéralisation</i>	15
<i>Figure 5 : Principe de l'électrodésionisation</i>	16
<i>Figure 6 : Principe général des différents types de filtration</i>	19
<i>Figure 7 : Principe de l'osmose inverse</i>	20
<i>Figure 8 : Principe de développement d'un biofilm bactérien</i>	24
<i>Figure 9 : Différence de structure des bactéries à Gram + et à Gram -</i>	27
<i>Figure 10 : Structure du LPS (lipopolysaccharide)</i>	28
<i>Figure 11 : Différence entre les exotoxines et les endotoxines</i>	29
<i>Figure 12 : La cytométrie en flux</i>	31
<i>Figure 13 : Principe de la bioluminescence</i>	32
<i>Figure 14 : Principe des ultrasons</i>	33
<i>Figure 15 : Principe de la microscopie confocale laser à balayage</i>	34
<i>Figure 16 : Principe de la méthode FISH</i>	35
<i>Figure 17 : Différentes conformations bactériennes au sein d'un biofilm</i>	35
<i>Figure 18 : Mécanismes de résistance du biofilm face aux UV</i>	37
<i>Figure 19 : Action des enzymes sur la matrice du biofilm</i>	38
<i>Tableau 1 : Tests sur l'eau purifiée vrac et l'eau purifiée conditionnée en récipients</i>	18
<i>Tableau 2 : Analyses effectuées sur l'eau purifiée</i>	18
<i>Tableau 3 : Tests sur l'eau pour préparations injectables en vrac et stérilisée</i>	22
<i>Tableau 4 : Analyses effectuées sur l'eau pour préparation injectables</i>	22



## I. Introduction

“To minimize the risk of biofilm formation, sterilization, disinfection or regeneration of water systems should be carried out according to a predetermined schedule and as a remedial action following out-of-limit or specification results”.

Cette phrase est issue de la nouvelle annexe 1 des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) et c'est la première fois que le terme biofilm apparaît. (1) C'est donc un nouvel enjeu à prendre en compte avec de nouvelles stratégies à adopter.

Les circuits d'eau apparaissent donc comme des vecteurs importants de contaminations microbiologiques ou physico-chimiques. En effet, l'eau est indispensable et omniprésente à plusieurs niveaux dans les industries pharmaceutiques. (2) Elle peut être utilisée comme matière première, excipient, ou encore dans le nettoyage et les processus de stérilisation. Elle constitue donc un point clé dans les processus de contrôle et de suivi. Une attention particulière doit donc lui être portée en fonction de son utilisation. Une eau potable ne sera pas de qualité suffisante pour la préparation de solutions injectables par exemple. (2) Dans ce contexte industriel, de l'eau de qualité supérieure est requise et le contrôle de cette eau est crucial, avec des traitements supplémentaires pour augmenter sa pureté.

L'eau peut véhiculer facilement des contaminants : c'est un facteur essentiel à la survie et à la multiplication des microorganismes et donc un lieu privilégié pour le développement microbien. Lorsque de l'eau est présente, le risque de retrouver des bactéries, levures et moisissures est majoré. Les réseaux d'eau sont donc un endroit propice à leur développement. Ainsi, dans les zones à atmosphère contrôlée (ZAC) de classe A et B les arrivées d'eau (évier, canalisations) sont exclues. (1)

Dans les circuits d'eau, les bactéries peuvent se retrouver sous la forme d'un biofilm. Un biofilm est un assemblage de bactéries entourées d'une matrice polysaccharidique, lui conférant une plus grande résistance face aux agressions extérieures qu'il pourrait subir (antibiotiques, biocides...). (3) Il apparaît donc important dans un contexte de production industrielle, de gérer cette question de biofilms dans les réseaux d'eau. Pour cela, des techniques et des méthodes de prévention, de détection et d'élimination des biofilms sont à mettre en œuvre.

Les enjeux sont multiples, premièrement, produire une eau de qualité satisfaisante en fonction de son utilisation, en accord avec les référentiels tels que la Pharmacopée Européenne et les Bonnes Pratiques de Fabrication.

Deuxièmement, assurer un suivi de cette production, incluant la désinfection des réseaux d'eau et son contrôle, par analyse de tendances des tests microbiologiques réalisés, selon une procédure validée.

Le présent manuscrit est divisé en 5 grandes parties. Une première partie introductive est consacrée à la définition des termes du sujet, les différents types d'eau et les biofilms. Une seconde partie porte sur la détection des biofilms, une troisième partie présente l'élimination des biofilms. La quatrième partie reprend les résultats d'un questionnaire destiné aux industries de santé sur la détection et l'élimination des biofilms, afin d'obtenir la vision terrain. L'ensemble de ces résultats est suivi d'une discussion générale, les conclusions et perspectives constituant ainsi la cinquième partie.

## 1. L'eau

L'eau est un élément indispensable à la vie sur Terre. Elle est présente et utilisée quotidiennement par chacun d'entre nous. Néanmoins, nous n'avons pas tous accès à de l'eau de même qualité notamment en matière de potabilité. (4) C'est donc un enjeu de santé publique majeur où des inégalités subsistent. Avoir accès à de l'eau potable résulte d'une gestion et d'un contrôle optimal des contaminations microbiologiques et physico-chimiques.

En 2021, d'après l'UNICEF, 91 % de la population mondiale a accès à de l'eau potable.(5) Parmi ces 91 %, seulement 74 % bénéficient d'une alimentation en eau gérée en toute sécurité, c'est-à-dire exempte de contaminations (microbiologiques, chimiques), disponible à n'importe quel moment et à un endroit dédié. La contamination la plus importante est la contamination bactériologique. En effet, il est estimé que plus de 2 milliards de personnes ont accès à de l'eau potable contaminée.(4) L'eau est ainsi un vecteur de multiples maladies telles que la dysenterie, les diarrhées, le choléra, la fièvre typhoïde ou encore la poliomyélite. (4)(6)

Une eau potable d'une certaine qualité est donc requise afin de protéger la population. C'est avant tout un enjeu majeur de santé publique qui est défini selon la directive 98/83/CE. Ce texte a pour but de « protéger la santé des personnes des effets néfastes de la contamination des EDCH (eaux destinées à la consommation humaine) en garantissant la salubrité et la propreté de celles-ci ».(7)

En France, le dernier arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et destinés à la consommation humaine, indique les spécifications microbiologiques et physico-chimiques à respecter pour une eau destinée à la consommation.(8)

Plus précisément, dans le domaine des industries pharmaceutiques, de nombreux référentiels tels que les Pharmacopées, livrent de précieuses informations sur l'art et la manière d'utiliser l'eau. Par exemple, dans la Pharmacopée Européenne, des monographies donnent des informations sur les différents types d'eau pouvant être produits et utilisés. Avant 2019, il existait 3 types d'eau décrits dans la Pharmacopée Européenne : l'eau hautement purifiée, l'eau pour préparations injectables (eau ppi) et l'eau purifiée. Depuis 2019, la monographie intitulée « eau hautement purifiée » a été supprimée.

Cette décision s'appuie sur le fait que la monographie « eau pour préparations injectables » a été révisée en apportant des précisions sur les procédés équivalents de production d'eau ppi qui étaient d'ores et déjà écrits dans la monographie « eau hautement purifiée ». Ces deux monographies étaient donc redondantes et il n'existe donc plus que deux types d'eau décrits.(9)

#### a. Eau potable

L'utilisation de l'eau potable apparaît à tous les niveaux de l'activité humaine, que ce soit dans le domaine domestique (hygiène, cuisine, boisson, piscines...), dans le domaine agricole (irrigation), dans le domaine industriel (industries textiles, électriques ...) ou dans le domaine de la santé (hôpitaux, industries pharmaceutiques...).

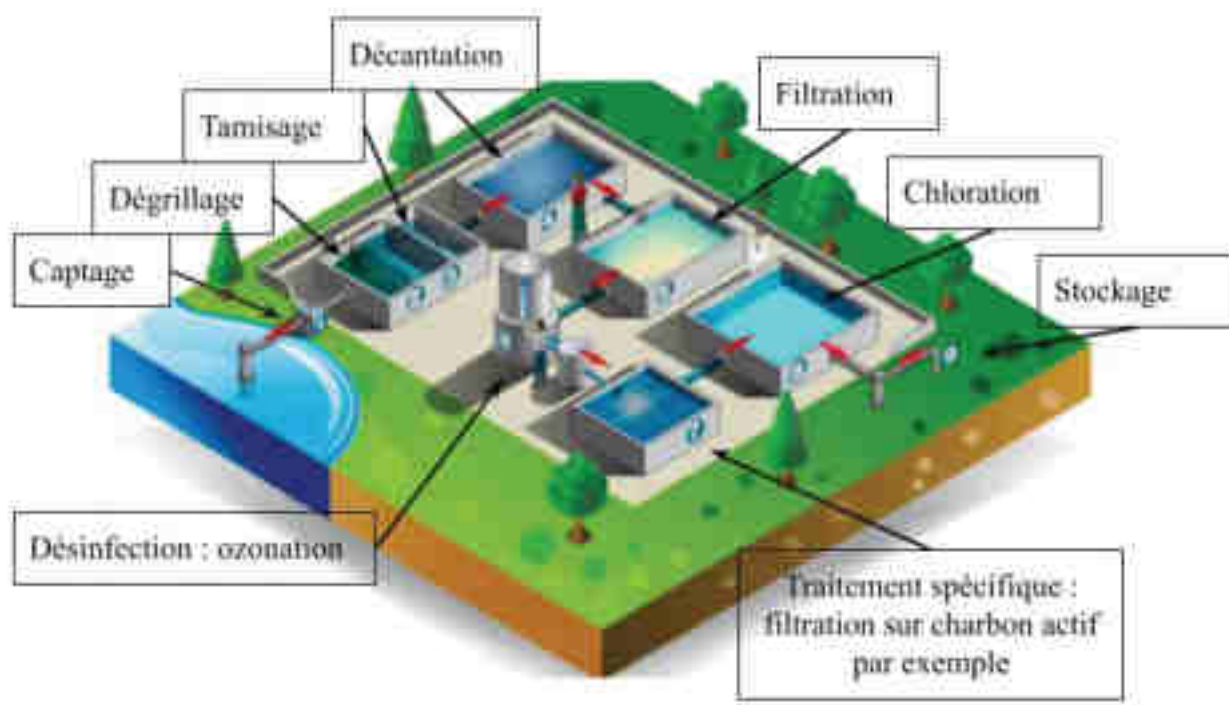
L'eau potable est issue d'une eau dite « brute » qui provient de différentes sources (rivières, fleuves, lacs, glaciers, nappes phréatiques). De ce fait, à ce stade, l'eau est impropre à la consommation et contient de multiples contaminants (microorganismes, algues, particules organiques, minérales, chimiques...) qui peuvent varier selon les conditions climatiques et environnementales (pollution, sécheresse...).(10) Cette eau est donc traitée de multiples façons afin de pouvoir donner de l'eau potable.(11)

Après captage de l'eau brute dans une source, celle-ci est acheminée vers une usine de potabilisation. Dans un premier temps l'eau subit une étape de dégrillage, une étape permettant d'éliminer les gros débris (cailloux, plastiques, feuilles...)(12) suivie d'une étape de tamisage, éliminant des débris de tailles inférieures (brindilles, graviers...). Par la suite, l'eau est décantée, permettant ainsi d'éliminer les grosses particules (sable, débris organiques, argiles...). L'étape suivante est la filtration sur sable qui a pour but d'intercepter les dernières particules visibles à l'œil nu. Les microorganismes ne seront pas retenus à cette étape, c'est pourquoi l'étape finale de désinfection est indispensable. Cette désinfection a pour but d'éliminer les agents pathogènes, par procédés chimiques (substances biocides) ou physiques (rayonnements).

Enfin, des étapes supplémentaires de filtration à l'aide de filtres à charbon actifs peuvent être ajoutées si par exemple l'eau contient des substances polluantes (hydrocarbures, pesticides).(13) Il est également réalisé une chloration de l'eau, en prévention des contaminations bactériennes qui peuvent survenir par la suite. (14)

Des contrôles sont réalisés à la fin de toutes ces étapes, à la recherche de caractéristiques bactériologiques et physico-chimiques qui doivent être en dessous d'un seuil. Ces contrôles sont assurés par l'Agence Régionale de Santé (ARS) et issus de la directive 98/83/CE.(7)

Le monopole de l'eau potable est détenu par plusieurs distributeurs recensés sur le territoire français. Les principaux distributeurs d'eau potable en France sont Veolia, Suez et Saur. (15)



*Figure 1 : Principe du traitement de l'eau brute en eau potable adapté de (13) : procédés de traitement de l'eau brute en eau potable de son captage à son stockage*

À partir de cette eau potable, il est donc possible de fabriquer plusieurs types d'eau qui seront utilisés dans les industries pharmaceutiques par exemple. L'eau potable peut être utilisée dans des procédés de fabrication (16) si celle-ci se révèle conforme face aux recommandations de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en termes de qualité de l'eau potable.

Lorsque l'eau potable ne suffit pas pour atteindre les spécifications, il est possible d'utiliser de l'eau purifiée ou de l'eau pour préparations injectables (eau ppi).

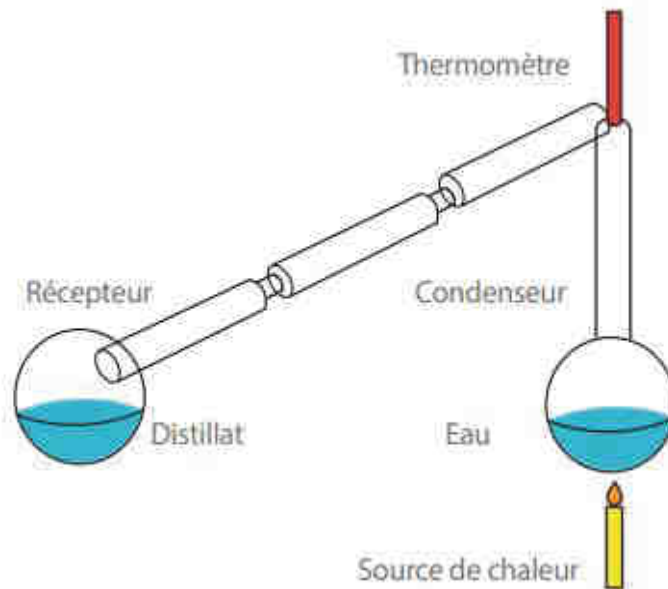
Pour produire ces 2 types d'eau, l'eau potable est la base de la production. Ainsi, la maîtrise de la qualité de l'eau tout au long de sa production, de son stockage et de sa distribution nécessite une surveillance sur la qualité microbiologique et physico-chimique.

#### b. Eau purifiée

L'eau purifiée en vrac ou conditionnée en récipients peut être utilisée pour la préparation de médicaments non stériles et apyrogènes.

De ce fait, l'eau purifiée vrac est au moins issue d'une eau de qualité potable. (17) D'après la monographie « Eau purifiée » de la Pharmacopée Européenne, l'eau purifiée vrac peut être obtenue par différentes méthodes. Ces méthodes peuvent être la distillation, l'échange d'ions ou l'osmose inverse. D'autres méthodes sont possibles mais elles devront être adaptées. (18)

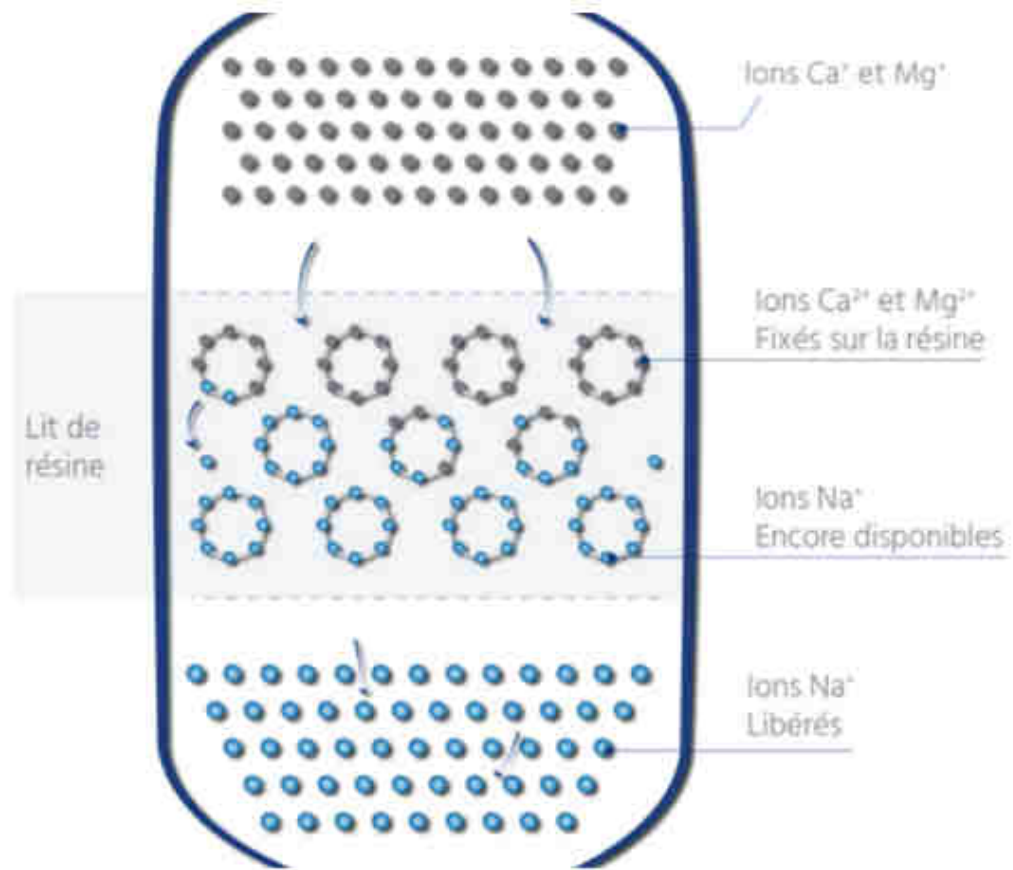
Une des méthodes employées pour la production de ce type d'eau est la distillation. Il s'agit d'un procédé qui consiste à chauffer l'eau jusqu'à son évaporation puis à condenser la vapeur obtenue, permettant ainsi d'obtenir à nouveau de l'eau sous forme liquide et cette fois-ci, exempt de contaminations (Figure 2). Ce procédé est utilisé à la fois pour la production d'eau purifiée et d'eau ppi.(18)(19)



*Figure 2 : Principe simplifié du processus de distillation (21)*

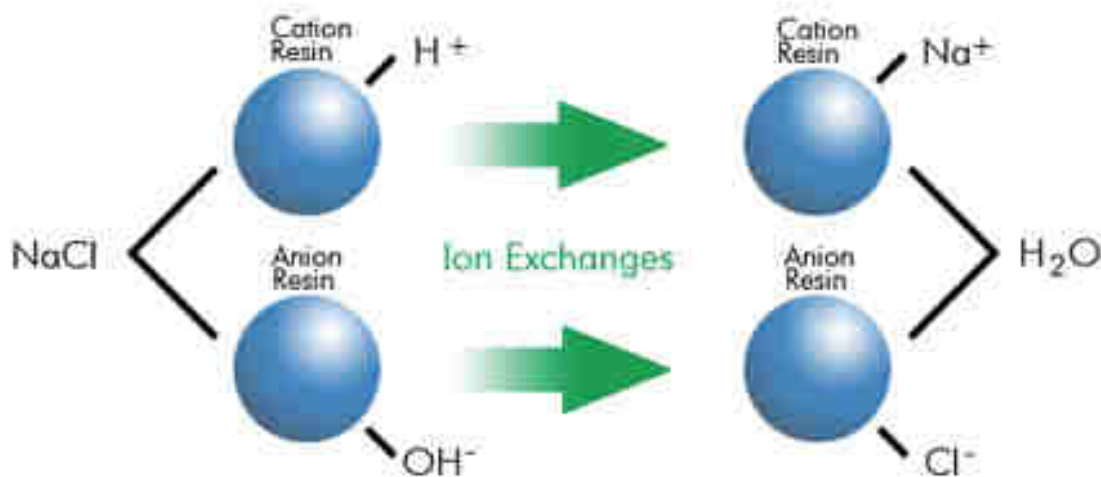
Une autre méthode est également énoncée dans la monographie ; l'échange d'ions. C'est un terme global qui regroupe plusieurs techniques telles que la déminéralisation ou désionisation et l'adoucissement.(20) Le point commun de ces techniques est l'utilisation de résines.(21) Ces résines sont des échangeurs d'ions permettant d'éliminer des ions d'une solution par adsorption en les remplaçant par d'autres. Une résine est un polymère contenant un ion fixe et un ion mobile. Cet ion mobile est soit positif ou négatif et définit ainsi le type de résines : cationique ou anionique. Pour préserver l'électroneutralité, un ion traversant la résine précipite donc la sortie d'un autre ; c'est l'échange d'ions. (22)

L'adoucissement de l'eau est effectué lorsque l'eau est dite trop dure, c'est à dire chargée en ions et plus précisément en sels de calcium et magnésium, responsables de dépôts solides, couramment appelés tartre. Ce procédé permet donc de limiter l'entartrage des circuits d'eau.(20) L'adoucissement de l'eau permet donc d'éliminer cette dureté en utilisant le système de résines échangeuses d'ions. Des résines cationiques sont donc utilisées pour capter ces ions et les échanger avec l'ion mobile de la résine, l'ion sodium ( $\text{Na}^+$ ) (Figure 3).



*Figure 3 : Principe de l'adoucissement d'après (25), l'eau circule du haut vers le bas, chargée en ions calcium et magnésium, traverse le lit de résine et sort dépourvue de ces ions*

La déminéralisation ou désionisation, se base toujours sur l'utilisation de résines mais cette fois-ci de 2 types ; une résine cationique et une résine anionique. L'utilisation combinée de ces 2 résines permet à la fois de capter des cations (magnésium, calcium, sodium...) qui sont échangés par des ions  $H^+$  et de capter sur la résine anionique, des anions (chlorure, bicarbonates...) qui sont échangés par des ions  $OH^-$ . Cette utilisation concomitante permet ainsi de libérer de l'eau  $H_2O$  (Figure 4).



*Figure 4 : Principe de la déminéralisation (26) : les résines cationiques sont chargées en ions  $H^+$  ; les résines anioniques en ions  $OH^-$ , lors de l'échange ionique les ions d'un sel ( $NaCl$ ) sont échangés, libérant ainsi une molécule d'eau ( $H^+ + OH^-$ )*

L'adoucissement et la déminéralisation sont deux techniques qui ne permettent pas d'éliminer les microorganismes, ni les matières organiques, les pyrogènes ou d'autres particules.

Les résines mises en œuvre lors de ces procédés ne sont pas utilisables à l'infini sans intervention de maintenance. En effet, lorsque les résines sont saturées elles doivent être remplacées ou régénérées.(23)

Des solutions de régénération existent et varient en fonction du type de résine impliquée dans le système.

Les résines cationiques chargées en ions  $Na^+$  sont régénérées avec un sel ( $NaCl$ ), les résines chargées en ions  $H^+$  avec des solutions acides ( $HCl$ ,  $H_2SO_4$  acide chlorhydrique ou sulfurique) et les résines anioniques chargées en ions  $OH^-$  avec des solutions basiques ( $NaOH$  hydroxyde de sodium).(20)

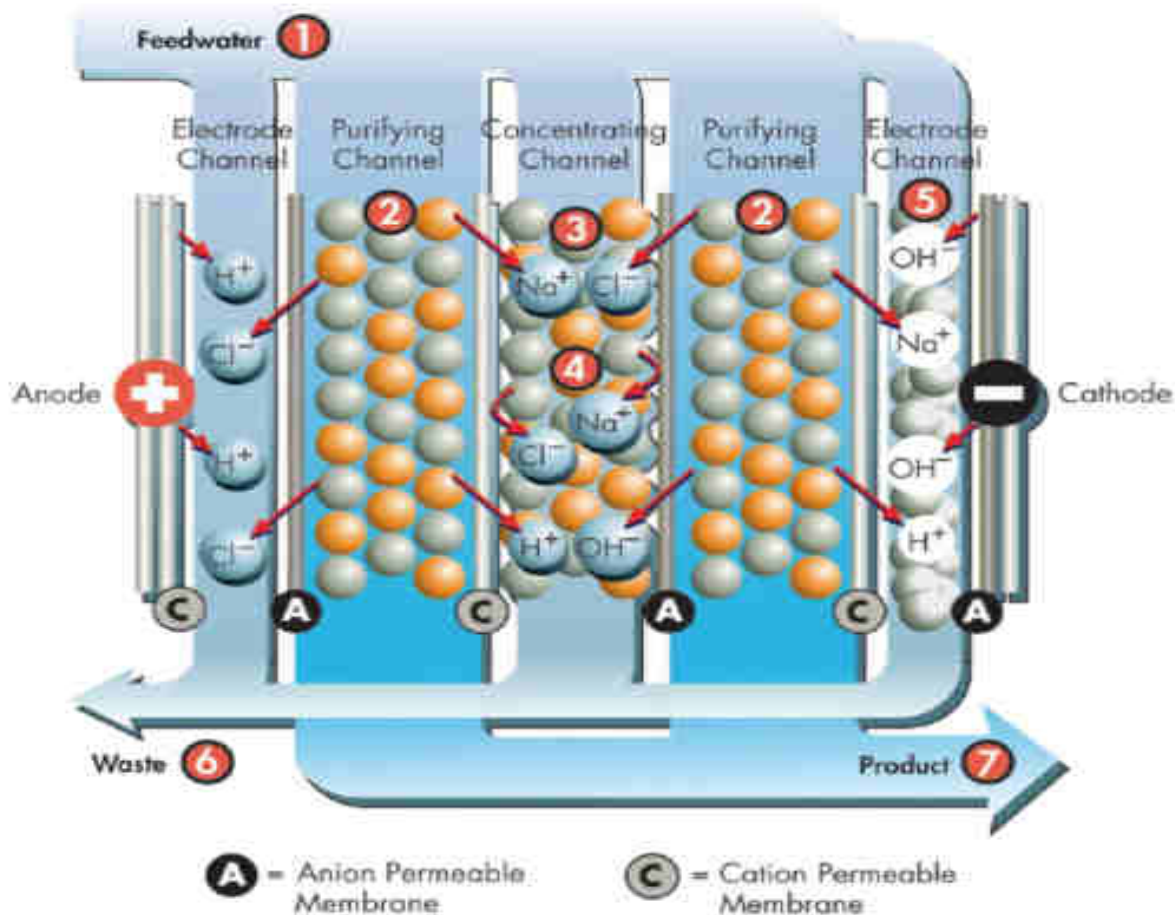
Une autre méthode basée sur l'utilisation de résines et qui est énoncée dans la monographie de l'eau pour préparations injectables existe, il s'agit de l'électrodésionisation. C'est une technique qui repose également sur l'échange ionique avec l'utilisation de résines et de membranes échangeuses d'ions.

Cette technique apporte un avantage supplémentaire conséquent, une régénération automatique des résines. Il n'y a donc plus besoin de remplacer les résines ou de les régénérer. (24)

Ce système est composé d'une résine cationique et d'une résine anionique. Autour de ces résines, des membranes anioniques et cationiques sont disposées. Des électrodes terminent le système (Figure 5).(25)

L'eau traversant la résine, les ions sont donc attirés par les électrodes positives ou négatives en fonction de leur charge. Sur le parcours vers l'électrode, les ions vont se heurter à une membrane de charge opposée à eux, créant ainsi un autre courant concentré en ions. (26)

Grâce aux électrodes et au courant électrique, la formation d'ions  $H^+$  et  $OH^-$  est faite par dissociation de l'eau sous l'effet du courant électrique permettant de régénérer les résines. Avec ce système, il en ressort une eau désionisée (27).



*Figure 5 : Principe de l'électrodésionisation (32) : l'eau traverse le système composé de membranes et résines soumises à un courant électrique*

Cette technique tend à être employée en fin de système de purification d'eau (26) puisqu'elle ne permet pas non plus d'éliminer particules, micro-organismes, matières organiques et pyrogènes(28) . Cette méthode peut toutefois être couplée à de l'osmose inverse.(26)(24)

### b.1 Eau purifiée vrac

L'eau purifiée vrac est au moins issue d'une eau de qualité potable. (17) Lorsque cette eau est produite par l'une ou par la combinaison de méthodes décrites ci-dessus, des tests additionnels sont effectués afin de contrôler ses caractéristiques.

Tout d'abord, une surveillance microbiologique est requise lors de sa production mais aussi lors de sa conservation. Cela permet ainsi de contrôler et maîtriser le nombre de germes microbiens qui pourrait être présent. Le seuil fixé par la Pharmacopée Européenne est de 100 UFC/ml après filtration sur membrane et dénombrement sur milieu R2A (Reasoner's 2 Agar).



Puis, d'autres critères sont également contrôlés et mesurés tels que la teneur en carbone organique total (COT) et la conductivité.

Ces deux paramètres sont importants à mesurer, ils reflètent la contamination en composés organiques et inorganiques. La mesure du carbone organique total (COT) est un indicateur non spécifique qui met en évidence la quantité de composés organiques dans l'eau.(29) Ces composés organiques peuvent être issus de sources biologiques (plantes, animaux) ou de toutes autres sources contenant du carbone.(30)

Quant aux composés inorganiques, ils sont mis en évidence par la mesure de la conductivité.

La conductivité est une mesure non spécifique de pollution minérale (ions) qui se traduit par la capacité de l'eau à conduire un courant électrique. La conductivité d'une solution dépend de multiples facteurs tels que la concentration ionique, la valence des ions, la nature de la solution (acide, basique ou neutre), et de la température. Ainsi, la conductivité, associée à la température, traduit l'état de la minéralisation totale d'une eau. Plus la température augmente et plus la conductivité augmente. Cela est dû à l'augmentation de la mobilité des ions facilitant alors le passage du courant.(31)

Des composés additionnels sont également recherchés, tels que les nitrates, l'aluminium ou encore des endotoxines bactériennes. (18)

## b.2 Eau purifiée conditionnée en récipients

L'eau purifiée conditionnée en récipients répond aux mêmes exigences que l'eau purifiée vrac mais avec une exigence supplémentaire en termes de tests effectués pour la mise en évidence d'autres composés.

Ces tests comprennent la mesure de l'acidité ou de l'alcalinité, la recherche de substances oxydables, d'ions chlorures, sulfates, ammonium, calcium et magnésium. Le résidu à l'évaporation et la contamination microbienne sont également évalués. Pour la contamination microbienne, le critère d'acceptation pour les DGAT (Dénombrement des Germes Aérobie Totaux) est de 100 UFC/ml.(18) L'explication du choix de ces marqueurs sont décrits plus en détails dans la partie II.

*Tableau 1 : Tests sur l'eau purifiée vrac et l'eau purifiée conditionnée en récipients*

Eau purifiée vrac	Eau purifiée conditionnée en récipients
Surveillance microbiologique	Surveillance microbiologique
Carbones organiques total ou substances oxydables	Carbones organiques total ou substances oxydables
Conductivité	Conductivité
Nitrates	Nitrates
Aluminium	Aluminium
Endotoxines bactériennes*	Endotoxines bactériennes
	Acidité ou alcalinité
	Substances oxydables
	Chlorures
	Sulfates
	Ammonium
	Calcium et magnésium
	Résidu à l'évaporation
	Contamination microbienne

\* « si l'eau purifiée en vrac est destinée à la fabrication de solutions pour dialyse sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes » (32)

*Tableau 2 : Analyses effectuées sur l'eau purifiée*

		Normes réglementaires	
Analyses physico-chimiques	Conductivité (à 20 °C)	$\leq 4,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	Monographie de l'eau purifiée issue de la Pharmacopée Européenne (0008F)
	COT ou substances oxydables	$\leq 0,5 \text{ mg/L}$	Pharmacopée Européenne chapitre 2.2.44
Analyses microbiologiques	Germes totaux	100 UFC/mL	Pharmacopée Européenne chapitre 2.6.12

c. Eau pour préparations injectables (eau ppi)

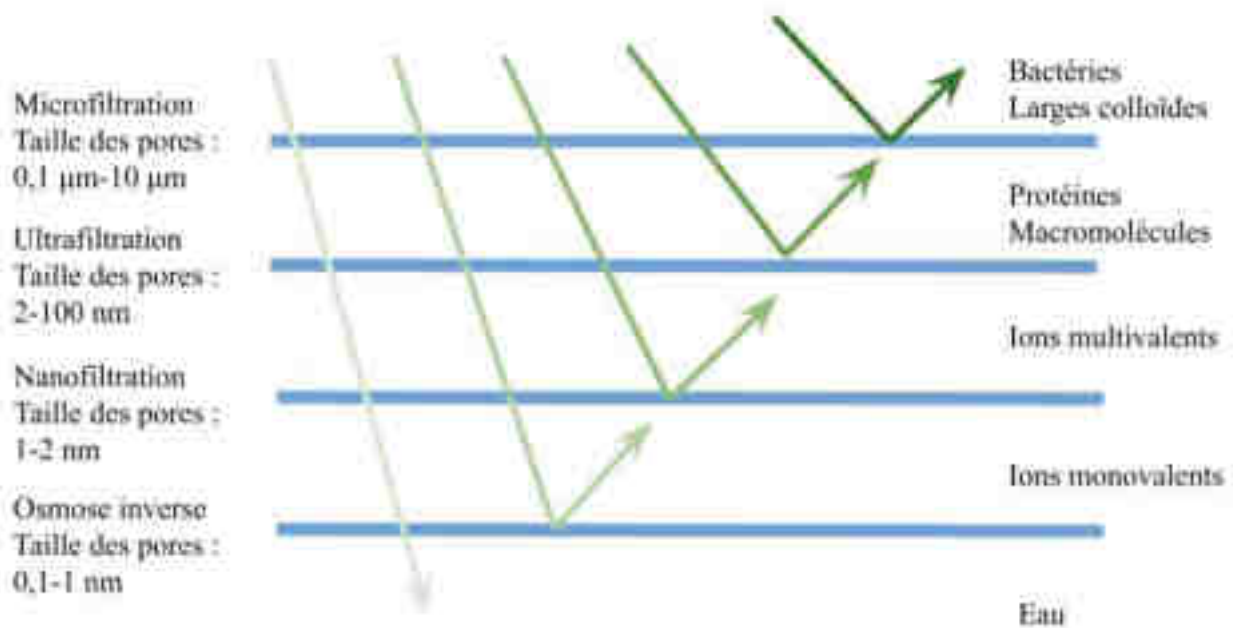
L'eau pour préparations injectables est obtenue à partir d'une eau potable destinée à la consommation humaine mais peut aussi être produite à partir d'une eau purifiée.

Pour produire ce type d'eau il existe donc plusieurs techniques. Certaines sont communes avec la production d'eau purifiée et c'est la combinaison de ces méthodes ainsi que de nouvelles, qui permet d'aboutir à de l'eau pour préparations injectables (eau ppi).

Cela peut être par distillation, par osmose inverse en simple ou double passage, pouvant être couplée à d'autres techniques comme l'électrodésionisation, l'ultrafiltration ou encore la nanofiltration afin d'atteindre la qualité d'eau attendue. (19)

La filtration est définie par le passage d'un liquide à travers un filtre, d'une certaine composition et d'une certaine taille de pores. C'est cette taille de pores qui conditionne le type de filtration.(33)

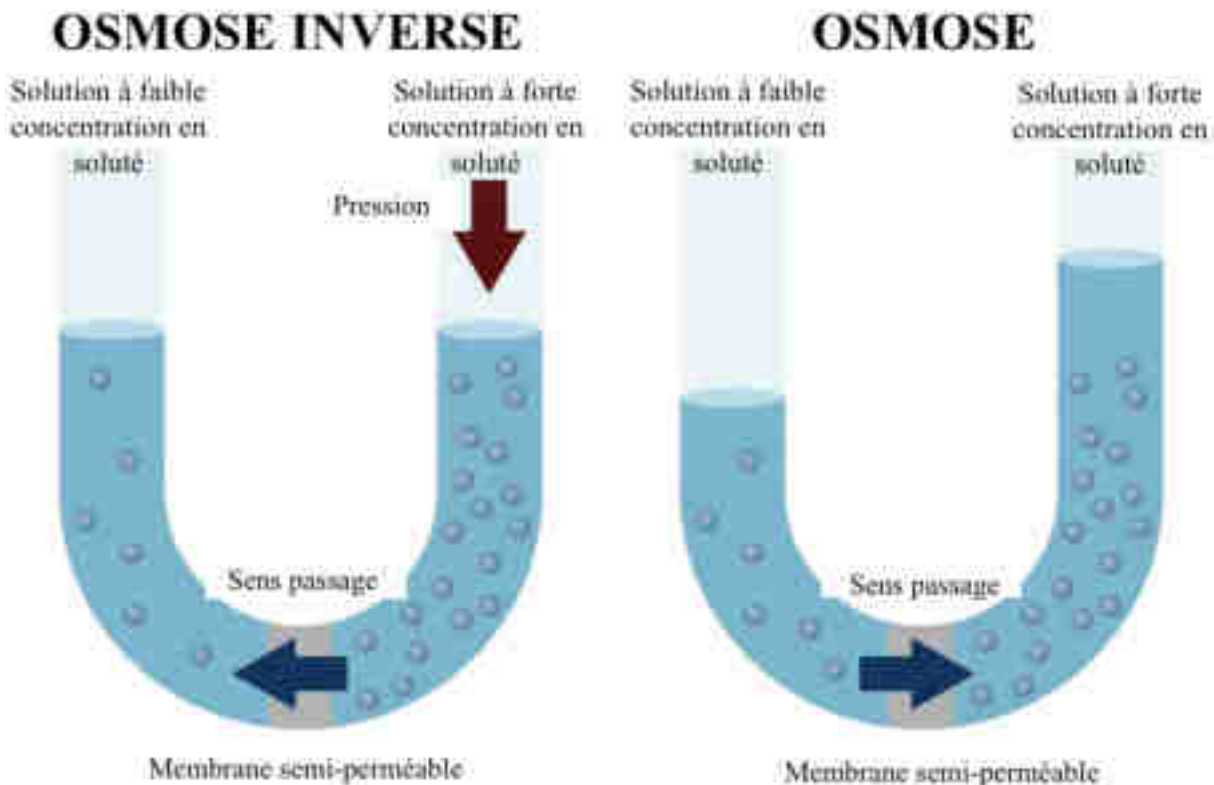
Le figure ci-dessous reprend trois types de filtration qui dépendent de la taille des pores ainsi que des impuretés organiques et inorganiques filtrées ou non.



*Figure 6 : Principe général des différents types de filtration issue et adaptée de (34). Les lignes bleues symbolisent les différents types de filtres. Les lignes vertes symbolisent le passage de l'eau et des éléments retenus en fonction de chaque type de filtration.*

La microfiltration repose sur l'utilisation de filtres dont la taille des pores, de 10 µm à 0,1 µm pour éventuellement retenir les bactéries. (35) L'ultrafiltration repose sur l'utilisation de filtres dont la taille des pores est comprise entre 2 et 100 nm, pour retenir les protéines, virus, polymères et colloïdes. La nanofiltration dépend de l'utilisation de filtres dont la taille des pores est comprise entre 1 et 2 nm afin de retenir les ions multivalents.(34)

Le dernier cas de filtration est l'osmose inverse. Il s'agit d'un principe qui s'oppose à l'osmose, un phénomène naturel qui se met en place lorsque 2 solutions de concentrations différentes sont séparées par une membrane semi-perméable. De façon naturelle, la solution ayant la concentration la plus faible (hypotonique) va traverser la membrane et se rendre dans la solution ayant la concentration la plus élevée (hypertonique) jusqu'à arriver au point d'isotonie entre les 2 solutions. La pression osmotique associée est la pression minimale à appliquer pour empêcher ce phénomène.(36) L'osmose inverse est donc un phénomène non naturel qui se traduit par le fait d'appliquer une pression supérieure à la pression osmotique, forçant donc la solution la plus concentrée à passer à travers la membrane semi-perméable.



*Figure 7 : Principe de l'osmose inverse issue et adaptée de (37) : le schéma de gauche montre la solution à forte concentration en soluté traversant la membrane semi-perméable de droite à gauche grâce à la pression appliquée ; c'est l'osmose inverse. Le schéma de droite montre la solution à faible concentration en soluté traversant la membrane semi-perméable de gauche à droite sans application de pression ; c'est l'osmose.*

Ce système de filtration, grâce à sa membrane semi-perméable, permet de retenir les impuretés présentes dans l'eau, ne laissant passer que les molécules d'eau. En retenant les impuretés organiques et inorganiques, ce système permet d'abaisser la concentration en carbone total (COT) et la conductivité de l'eau. Cependant, au contact d'une eau chargée en bactéries, ces membranes d'osmose inverse peuvent être colonisées par des biofilms. (38)

### c.1 Eau pour préparations injectables en vrac

D'après la Pharmacopée Européenne, l'eau pour préparations injectables en vrac est utilisée pour l'administration parentérale à véhicule aqueux.

Tout d'abord, une surveillance microbiologique est requise lors de sa production mais aussi lors de sa conservation. Cela permet ainsi de contrôler et maîtriser le nombre de germes microbiens qui pourrait être présent. Le seuil fixé par la Pharmacopée Européenne est de 10 UFC/100ml, après filtration sur membrane et dénombrement sur milieu R2A (Reasoner's 2 Agar).

Les contrôles effectués sur ce type d'eau sont divers et certains sont identiques à ceux réalisés pour le contrôle de l'eau purifiée. La conductivité, la mesure du carbone organique total (COT), les nitrates, l'aluminium, les endotoxines bactériennes et la contamination microbienne sont communs. La conservation et la distribution de cette eau doit être faite de façon à empêcher la croissance de microorganismes et à éviter toute autre contamination.

### c.2 Eau stérilisée pour préparations injectables

L'eau stérilisée est utilisée pour la dissolution ou la dilution de substances ou de préparations pour administration parentérale.

Cette eau est répartie dans des récipients fermés appropriés leur permettant une stérilisation par la chaleur. Plusieurs essais sont réalisés sur cette qualité d'eau, la mesure de l'acidité ou de l'alcalinité, la conductivité, la recherche de substances oxydables, d'ions chlorures, nitrates, sulfates, aluminium, ammonium, calcium et magnésium. Les résidus à l'évaporation, la contamination particulaire, la mesure des endotoxines bactériennes sont également testés. Cette eau doit aussi satisfaire à l'essai de stérilité.(19)

Tableau 3 : Tests sur l'eau pour préparations injectables en vrac et stérilisée

Eau pour préparation injectables (eau ppi) en vrac	Eau stérilisée pour préparation injectables
Surveillance microbiologique	Conductivité
Carbone organique total	Substances oxydables
Conductivité	Aluminium*
Nitrates	Résidus à l'évaporation
Aluminium	Contamination particulière : particules non visibles
Endotoxines bactériennes	Stérilité
	Endotoxines bactériennes

\* « si l'eau stérilisée pour préparations injectables est destinée à la fabrication de solutions pour dialyse » (39)

Tableau 4 : Analyses effectuées sur l'eau pour préparation injectables

		Normes réglementaires	
Analyses physico- chimiques	Conductivité (à 20°C)	$\leq 1,1 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$	Monographie de l'eau pour préparations injectables issue de la Pharmacopée Européenne (0169F)
	COT ou substances oxydables	$\leq 0,5 \text{ mg/L}$	Pharmacopée Européenne chapitre 2.2.44
Analyses microbiologiques	Germes totaux (germes/L)	$< 10 \text{ UFC} / 100 \text{ mL}$	Pharmacopée Européenne chapitre 2.6.12
Analyses endotoxines	Endotoxines bactériennes (UI/mL)	$\leq 0,25 \text{ UI/mL}$	Pharmacopée Européenne chapitre 2.6.14

Produire ces types d'eau est donc une nécessité car elle constitue une matière première de choix. Son stockage et sa distribution sont donc des enjeux majeurs afin de maintenir l'eau dans les conditions définies qui lui sont propres à son utilisation. Détecter au plus tôt et éliminer le plus efficacement possible les sources de contaminations sont deux points indissociables dans la quête d'une eau toujours plus propre.

## 2. Les biofilms

Les biofilms sont une entité à part entière, ils font partie intégrante du monde du vivant et sont retrouvés sur de multiples surfaces. Ces surfaces peuvent être biotiques(40) : chez l'Homme et l'animal ils vont par exemple être retrouvés à la surface des muqueuses (buccale, intestinale...). Ces biofilms peuvent aussi se retrouver dans l'environnement sur des surfaces végétales (feuilles) ou minérales (rochers, galets au fond des mers)(41). Les biofilms sont également retrouvés sur des surfaces abiotiques telles que des tuyaux, coques de bateaux, ou des cathéters. (42) Les biofilms sont un système avec une architecture complexe et une population microbienne hétérogène. Cette structure, le biofilm, est avant tout une stratégie d'adaptation des microorganismes pour survivre dans des milieux hostiles. Au sein de ce dernier, les bactéries sont par exemple plus résistantes aux antibiotiques ainsi qu'aux désinfectants par rapport aux bactéries sous forme planctonique, c'est-à-dire libres en suspension. (43)

### a. Formation du biofilm

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un cycle bien défini. Tout d'abord, cela débute par l'adhérence de bactéries planctoniques sur une surface biotique ou abiotique (Figure 8). Cette adhérence initiale est réversible. Lorsque cette adhérence se prolonge, les bactéries se divisent, s'agrègent, formant alors des micro-colonies. Si l'environnement extérieur leur est favorable, le biofilm en formation mature et s'épaissit.

Cette maturation est liée à la sécrétion par les bactéries d'une matrice extracellulaire très hydratée, riche en polysaccharides, créant un microclimat favorable à leur survie. (40) Les polysaccharides sont un élément important de la composition de la matrice, assurant cohésion, rétention d'eau et ab/adsorption de composés organiques et inorganiques.(44) Cette matrice contient aussi d'autres constituants tels que des protéines, lipides, ADN extracellulaires (45). La proportion de ces composants peut varier, en fonction du type de bactéries impliquées et des conditions environnementales. (46)

Cette matrice polysaccharidique intervient comme une protection vis-à-vis des agents extérieurs. En effet, elle protège les bactéries face à d'éventuelles conditions extérieures qui leur seraient défavorables telles qu'un stress osmotique, une dessiccation, l'exposition à des agents biologiques ou chimiques, désinfectants, antibiotiques...(44)

Cette protection apportée par la matrice n'est néanmoins pas absolue. En effet, la combinaison de plusieurs méthodes d'élimination est nécessaire pour déstructurer la matrice et permettre ainsi l'exposition directe des bactéries. Ces bactéries sont donc alors plus vulnérables face aux différents agents d'élimination.

Au cœur du biofilm, un véritable réseau se met en place afin d'acheminer des nutriments et de l'oxygène aux bactéries se trouvant à la base du biofilm, et d'autre part, d'éliminer les déchets accumulés vers la surface du biofilm. Un gradient s'établit entre l'apport en nutriments et en oxygène ainsi que l'élimination des déchets. (3) Le biofilm mature, peut libérer et disperser des bactéries dans l'environnement, colonisant d'autres surfaces et poursuivant ce cycle. (41)

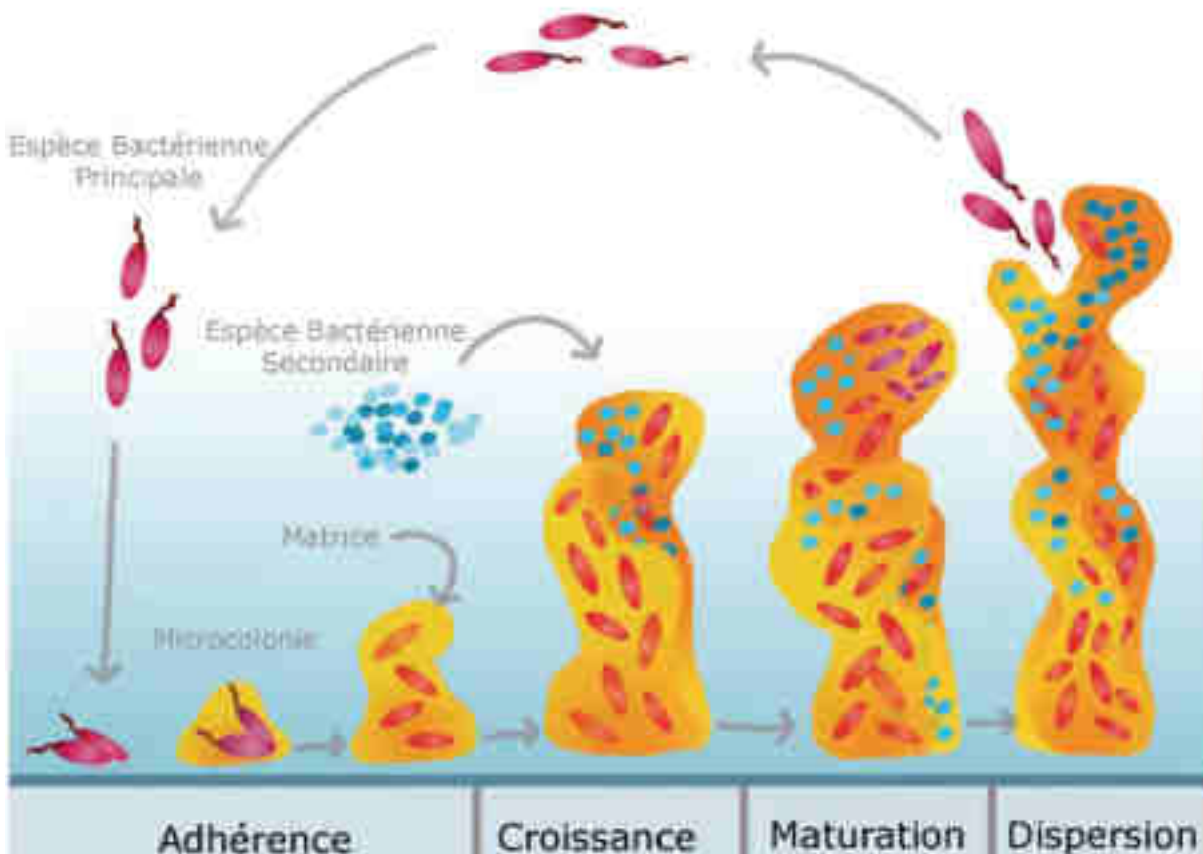


Figure 8 : Principe de développement d'un biofilm bactérien d'après (47) : cycle de formation d'un biofilm en quatre étapes (adhérence, croissance, maturation et dispersion)

#### b. Rôle du biofilm dans l'écosystème microbien

En tant que véritable entité, les biofilms peuvent être considérés comme un écosystème à part entière. En effet, leur nature est le plus souvent polymicrobienne : ils ne sont pas uniquement constitués de bactéries, à Gram positif et/ou à Gram négatif.(48) Des virus, moisissures, protozoaires, algues et levures peuvent en faire partie.(49) Cette hétérogénéité engendre ainsi une véritable communauté et permet une certaine tolérance du biofilm face aux agressions extérieures telles que l'utilisation des antibiotiques, désinfectants et antiseptiques.(40)(48)



Au sein du biofilm, une communication est établie afin de maintenir cette structure de résistance le plus longtemps possible. Les bactéries réagissent donc à de multiples signaux environnementaux (température, hygrométrie, éléments nutritifs) ainsi qu'à des signaux provenant des bactéries elles-mêmes, il s'agit du quorum sensing.(46) C'est un mode de communication utilisé par les bactéries qui est basé sur la sécrétion de petites molécules appelées autoinducteurs. Ces petites molécules ont la capacité d'induire plusieurs modifications au sein de la communauté bactérienne associée. (50)

De plus, le biofilm est aussi un endroit propice à l'échange de matériel génétique entre les bactéries. En effet, la proximité bactérienne générée au sein du biofilm permet d'échanger de l'ADN par conjugaison et donc de créer de l'évolution et la diversité génétique. Cette étroite collaboration entre les bactéries au sein du biofilm par échange de matériel génétique permet ainsi d'acquérir des formes de résistances à certains antibiotiques ou désinfectants par exemple.

Spécifiquement, dans les circuits d'eau, les principaux germes retrouvés sont des bactéries d'origine hydrique telles que les *Légionnelles*, les *Acinetobactéries* et les *Pseudomonas*. D'autres espèces bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas* sont également impliquées, il s'agit de *Pseudomonas picketti* nouvellement reclassée dans le genre *Ralstonia*. (51) et de *Burkholderia cepacia* anciennement *Pseudomonas cepacia*.(52) Ces genres bactériens sont retrouvés puisque l'environnement aqueux est propice à leur développement. (53) Les *Pseudomonas* ont en plus cette capacité bien reconnue pour former des biofilms.(41)

Ainsi, comme énoncé précédemment, plus le biofilm s'épaissit, dans un tuyau par exemple, plus il y a de risque qu'avec la pression hydrodynamique, des agrégats de ce biofilm se décrochent et aillent coloniser une autre portion du tuyau. L'importance de la détection et de l'élimination des biofilms est donc un enjeu majeur afin d'éviter la contamination complète des réseaux d'eau.

## II. Détection des biofilms

Les circuits d'eau sont des installations fermées, ce qui apporte une certaine complexité dans l'analyse des éventuels biofilms qui pourraient s'y développer. En effet, il n'est pas possible de les visualiser directement puisque les conduits sont généralement opaques. Leur détection est donc généralement faite de façon indirecte, par analyse de l'eau circulant dans les réseaux. Ces analyses sont primordiales pour toute structure au sein de laquelle des déviations dans la qualité de l'eau pourraient avoir un impact sur la production ou la santé des personnes. La robustesse et la sensibilité de ces contrôles nécessitent des matériels et des méthodes adaptées. Leur conception, leur mise en œuvre et leur interprétation impliquent l'engagement de personnels formés, notamment en vue de décider si un traitement des circuits est requis et si des mesures correctives doivent être prises.

La détection des germes est la plus évidente au moment de la dispersion du biofilm, lorsqu'ils sont relargués pour aller coloniser une autre portion du circuit d'eau. Les germes adhérents ne sont donc pas visibles lors des échantillonnages classiques. De plus, il est important de noter que lors de cette dispersion, si des bactéries planctoniques sont libérées, elles seront sensibles à la désinfection (UV par exemple). A contrario, s'il s'agit d'un morceau de biofilm c'est-à-dire avec sa matrice protectrice, les microorganismes seront ainsi protégés.

Statuer sur la présence ou non d'un biofilm n'est pas évident, la combinaison de plusieurs méthodes peut ainsi s'avérer nécessaire pour prendre une décision. Cette partie présente donc les différentes méthodes dont certaines sont décrites dans la Pharmacopée Européenne, qui peuvent être employées pour détecter une éventuelle contamination des circuits d'eau par des bactéries et potentiellement par des biofilms.

## 1. Contrôle de l'eau

D'après les BPF : « Lorsque l'eau potable ne suffit pas à assurer la qualité des substances actives et si des spécifications plus strictes pour la qualité physico-chimique et / ou microbiologique sont demandées, des spécifications appropriées de l'eau utilisée doivent être établies, pour la qualité physico-chimique, pour le dénombrement des germes totaux, pour le dénombrement des germes indésirables et / ou pour la concentration en endotoxines »

Ces spécifications sont définies dans la Pharmacopée Européenne avec les monographies de l'eau purifiée et de l'eau pour préparations injectables.

Ces contrôles des eaux sont définis au sein de chaque entreprise tant qu'ils répondent aux spécifications attendues. Ces contrôles sont une analyse indirecte qui permettent d'évaluer l'éventuelle contamination microbienne de différents points d'eau. En effet, en fonction de l'eau testée (eau purifiée, eau ppi) une certaine exigence est demandée vis-à-vis des divers contrôles.

La mesure régulière des paramètres physico-chimiques (COT, conductivité), microbiologiques (dénombrement microbien) et des endotoxines permettent également de renseigner de la qualité de l'eau.

### A. Mesure du COT (carbone organique total)

La mesure du carbone organique total (COT) est un indicateur non spécifique qui permet de mettre en évidence la quantité de composés organiques dans l'eau.(29) Ces composés organiques peuvent être issus de sources biologiques (plantes, animaux) ou de toutes autres sources contenant du carbone.(30)

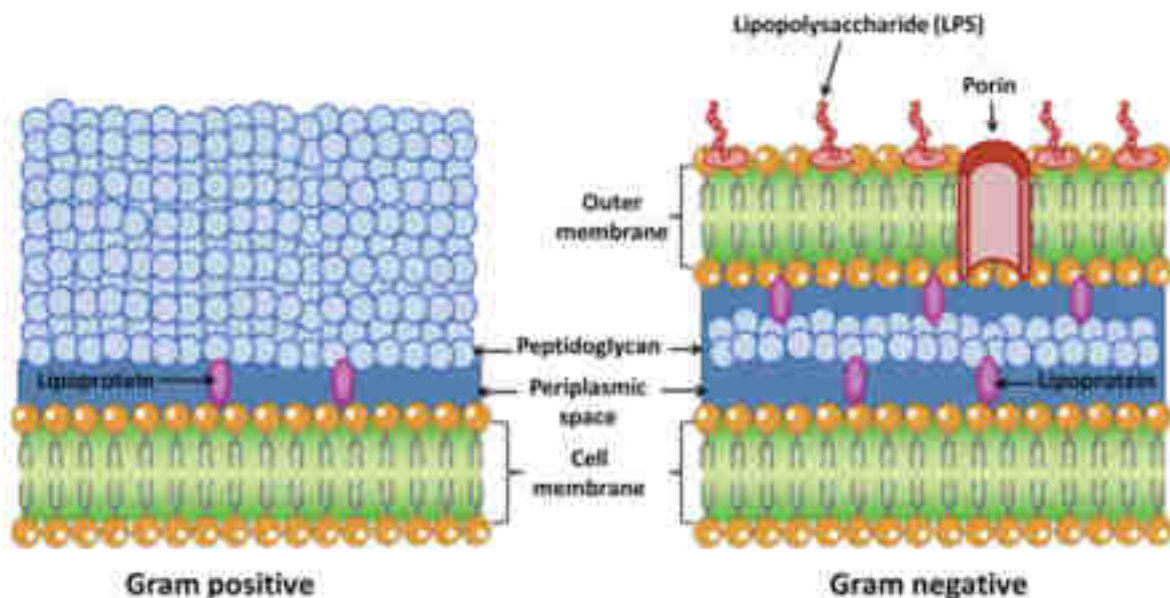
## B. Mesure de la conductivité

La mesure de la conductivité met en évidence les composés inorganiques. La conductivité est une mesure non spécifique de pollution minérale (ions) qui se traduit par la capacité de l'eau à conduire un courant électrique.(29) La conductivité d'une solution dépend de multiples facteurs tels que la concentration ionique, la valence des ions, la nature de la solution (acide, basique ou neutre), et de la température. Ainsi, la conductivité, associée à la température, traduit l'état de la minéralisation totale d'une eau. Plus la température augmente et plus la conductivité augmente. Cela est dû l'augmentation de la mobilité des ions facilitant alors le passage du courant.(31)

## C. Mesure des endotoxines

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides issus de la paroi des bactéries à Gram négatif ayant pour caractéristique d'être pyrogènes, c'est-à-dire induisant un état fébrile. (54)

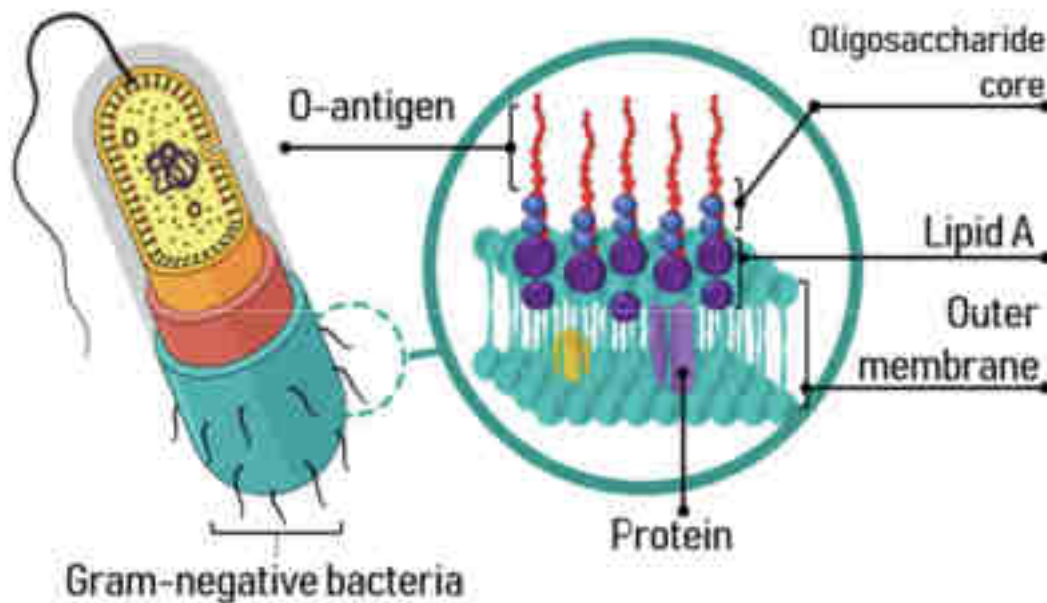
Les endotoxines ne doivent donc pas être retrouvées dans des médicaments stériles (injectables, ophtalmiques, intra-mammaires)(55). Leur recherche est donc à effectuer dans l'eau purifiée et l'eau pour préparations injectables. La structure des bactéries à Gram négatif se distingue de celles des bactéries à Gram positif par la présence d'une membrane externe pour les bactéries à Gram négatif (Figure 9). Cette membrane externe sert de première ligne de défense contre les agressions extérieures (environnement, facteurs chimiques, thermiques...)(56)



*Figure 9 : Différence de structure des bactéries à Gram + et à Gram - (57) : à gauche une paroi des bactéries dites à Gram positif avec une membrane et un peptidoglycane épais, à droite une paroi des bactéries dites à Gram négatif avec une membrane, un peptidoglycane fin et une membrane externe portant le LPS*

La membrane externe des bactéries à Gram négatif porte un composé particulier ; le lipopolysaccharide (LPS).

Le LPS est une molécule amphiphile composée de 3 parties ; le lipide A, partie hydrophobe, fixé à la membrane externe, suivi du core oligosaccharidique puis de l'antigène O, polysaccharide hydrophile. (56)



*Figure 10 : Structure du LPS (lipopolysaccharide) (58) : la membrane externe porte le LPS constitué de 3 parties, celle insérée dans la membrane, le lipide A, puis le core oligosaccharidique et l'antigène O à l'extrémité*

Le core oligosaccharidique central se lie directement au lipide A et contribue à la viabilité bactérienne et à la stabilité de la membrane externe. (58)

L'antigène O est le composant majeur du LPS présentant une grande variabilité. L'antigène O du LPS confère l'antigénicité à la cellule bactérienne. Sa taille et sa composition sont liées au potentiel de virulence de la souche bactérienne. (58)

Le lipide A est une structure composée d'acides gras qui est responsable de l'activité endotoxinique.(56) En effet, il induit une réponse immunitaire inflammatoire non contrôlée en incitant les macrophages à synthétiser de puissants médiateurs de l'inflammation. Cependant, en cas de surproduction systémique de ces médiateurs, l'inflammation peut provoquer un choc septique pouvant conduire à la mort. (59)

Les endotoxines sont donc libérées par sécrétion, dans des vésicules formées sur la membrane externe de la bactérie pendant la phase de croissance de la bactérie ainsi que lors de la mort bactérienne.(58)

Les exotoxines quant à elles, sont produites à l'intérieur des bactéries et libérées par ces dernières.(60)



*Figure 11 : Différence entre les exotoxines et les endotoxines d'après (61) : les exotoxines sont sécrétées dans le milieu par des bactéries intactes au niveau membranaire. Les endotoxines font partie de la membrane et sont relarguées lors de la lyse membranaire.*

#### D. Dénombrement sur gélose

Le dénombrement sur gélose permet d'évaluer la charge microbienne présente dans l'échantillon d'eau testé. Cette charge microbienne est définie dans la monographie de la Pharmacopée Européenne associée à chaque type d'eau. La méthode privilégiée pour cette analyse est celle du dénombrement microbien. Cette méthode est néanmoins peu spécifique.

Cette technique consiste à filtrer par filtration sur membrane les échantillons d'eau puis de déposer le filtre sur gélose R2A (Reasoner's 2 Agar) et à incuber à 30-35°C pendant minimum 5 jours. (32) (39)

En fonction des germes retrouvés sur le filtre après incubation, il est possible d'orienter le diagnostic vers une contamination du circuit d'eau par un biofilm. En effet, certaines bactéries dites filmogènes, ont cette capacité à être impliquées dans la formation de biofilms. C'est par exemple le cas des bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas*.(41)

Cette technique a néanmoins deux principaux inconvénients, le premier est que cette technique n'est finalement qu'une estimation de la charge microbienne associée à ce prélèvement. En effet, lors du dénombrement de nombreux facteurs rentrent en compte, comme la nature du milieu sur lequel le germe est déposé, le type de germe, les facteurs environnementaux (température, humidité...), avec un stress éventuel de microorganismes recherchés et donc un biais de croissance. Le second inconvénient est que cette technique ne permet pas la détection de tous les microorganismes éventuellement présents dans l'échantillon, comme les bactéries viables non cultivables. Néanmoins, une technique alternative peut pallier ces deux inconvénients ; la cytométrie en flux.(62)

## 2. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'analyse de particules en suspension tels que des cellules sanguines ou bactériennes. Chaque particule de la suspension est analysée individuellement avec une mesure simultanée de différents signaux optiques ou physiques émis par la particule traversant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont relatifs aux propriétés optiques intrinsèques de la particule et aux propriétés optiques induites par de la fluorescence naturelle ou artificielle des particules. (63)

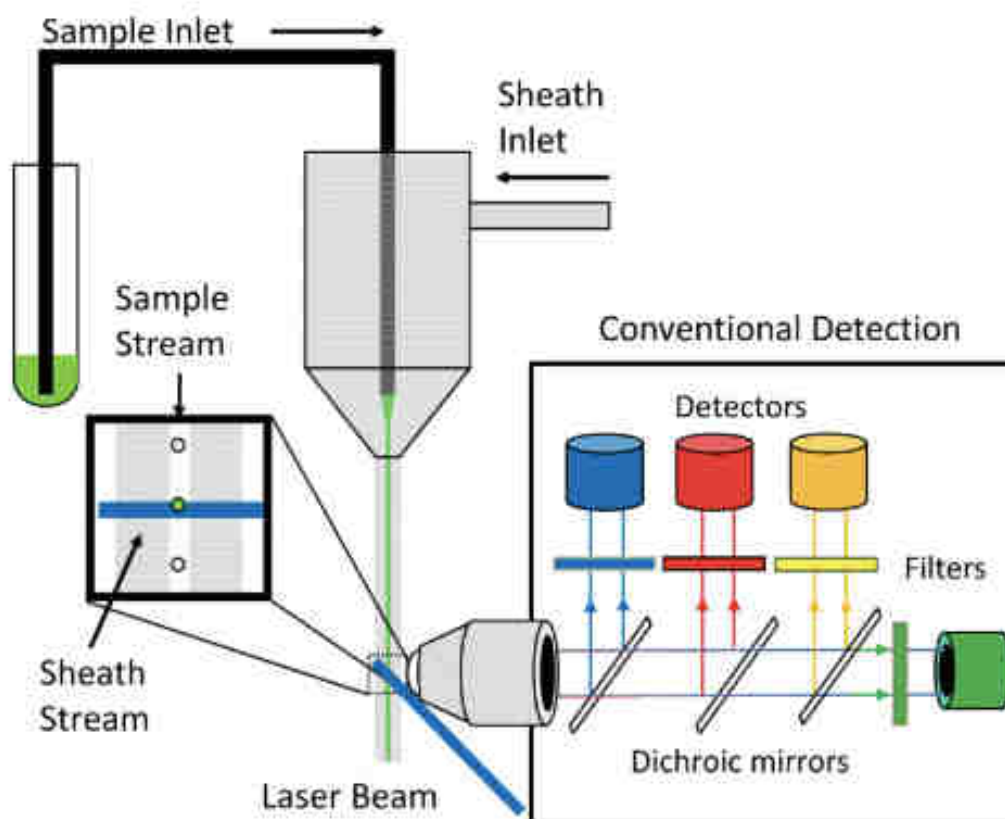
Les propriétés optiques intrinsèques correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés au volume de la particule (diffusion frontale, Forward Scatter FSC) et à la structure interne de la particule avec la prise en compte de paramètres tels que la forme du noyau, la présence de granules cytoplasmiques et la rugosité de la membrane (diffusion latérale à 90° Side Scatter SSC). Les signaux de diffusion et de fluorescence émis par les particules quand elles traversent le faisceau laser sont triés et dirigés vers les détecteurs à l'aide de miroirs et de filtres optiques. Le cytomètre en flux peut être équipé d'un trieur de cellules permettant de séparer des populations cellulaires d'un échantillon en fonction de leurs propriétés fluorescentes. (63)

Ainsi, comme énoncé précédemment, la cytométrie en flux permet de mettre en évidence de façon directe une contamination bactériologique des circuits d'eau.(64)

Pour cela, une fois l'échantillon d'eau prélevé, un marquage est réalisé afin de mettre en évidence les éventuelles bactéries présentes dans l'échantillon. Le marquage consiste par exemple à utiliser 2 fluorochromes : le SYBR Green II qui rentre dans les cellules et l'iodure de propidium qui ne pénètre pas les cellules. (65) Ce marquage combiné permet alors de distinguer 2 populations bactériennes, les viables et non viables ou mortes. (66)

Un des avantages de cette technique est la vitesse d'acquisition des données pour un très grand nombre de cellules, ce qui permet d'analyser des sous-populations cellulaires complexes. Néanmoins, la nécessité d'un échantillon sous forme de suspension restreint les possibilités d'analyses ainsi que l'éventuelle contamination croisée du système lorsque les échantillons sont multiples (suspension bactérienne versus suspension de cellules sanguines) sont deux inconvénients à relever.

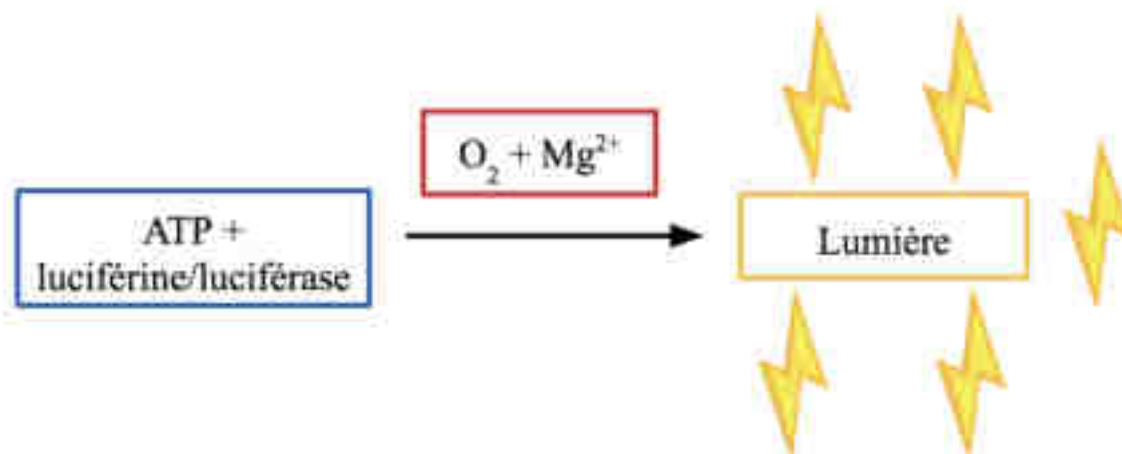
Par ailleurs, la cytométrie en phase solide est semblable à la cytométrie en flux mais avec pour principale différence la filtration sur membrane de l'échantillon avant analyse. C'est la surface de cette membrane qui est analysée par la suite. (66)



*Figure 12 : La cytométrie en flux adaptée de (67) : l'échantillon entre dans le système (sample inlet), les cellules sont individualisées grâce à un liquide de gaine (sheath inlet) et passent devant un laser et sont détectées grâce à des miroirs, filtres et détecteurs*

### 3. ATP-métrie

L'ATP-métrie (Adénosine Tri-Phosphate) est l'une des méthodes décrites dans le chapitre 5.1.6 « Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique » de la Pharmacopée Européenne version 11.0 dans le paragraphe 2.1.4 bioluminescence. L'ATP est la première source d'énergie de toute cellule vivante (68), ainsi cette activité énergétique peut donc être mesurée grâce à cette méthode. Cette technique de biologie moléculaire est basée sur le principe de bioluminescence. L'ATP en présence d'un substrat (luciférine) et de l'enzyme (luciférase),(69) déclenche une réaction chimique provoquant cette bioluminescence alors détectable et quantifiable à l'aide d'un luminomètre.(70)



*Figure 13 : Principe de la bioluminescence*

Il existe deux types d'ATP, l'ATP libre, libéré par les cellules mortes ou lysées et l'ATP intracellulaire présent dans les cellules encore vivantes.

En prenant pour exemple la contamination bactérienne, la mesure de l'ATP intracellulaire indique la contamination bactérienne en temps réel d'un échantillon d'eau. Pour s'affranchir de l'ATP libre dans l'échantillon, une étape de filtration permet d'éliminer l'ATP sous forme libre. Les éventuelles bactéries sont d'abord retenues sur un filtre, puis une étape de lyse est effectuée pour libérer l'ATP intracellulaire. Ce sont donc les bactéries vivantes qui sont quantifiées. (71) L'avantage de cette technique est que les bactéries viables non cultivables (VBNC) seront aussi prises en compte (72), ce qui n'est pas le cas lors du dénombrement classique sur gélose. Néanmoins, des facteurs liés à l'échantillon tels que la turbidité et la couleur peuvent altérer les mesures de bioluminescence.

#### 4. Ultrasons

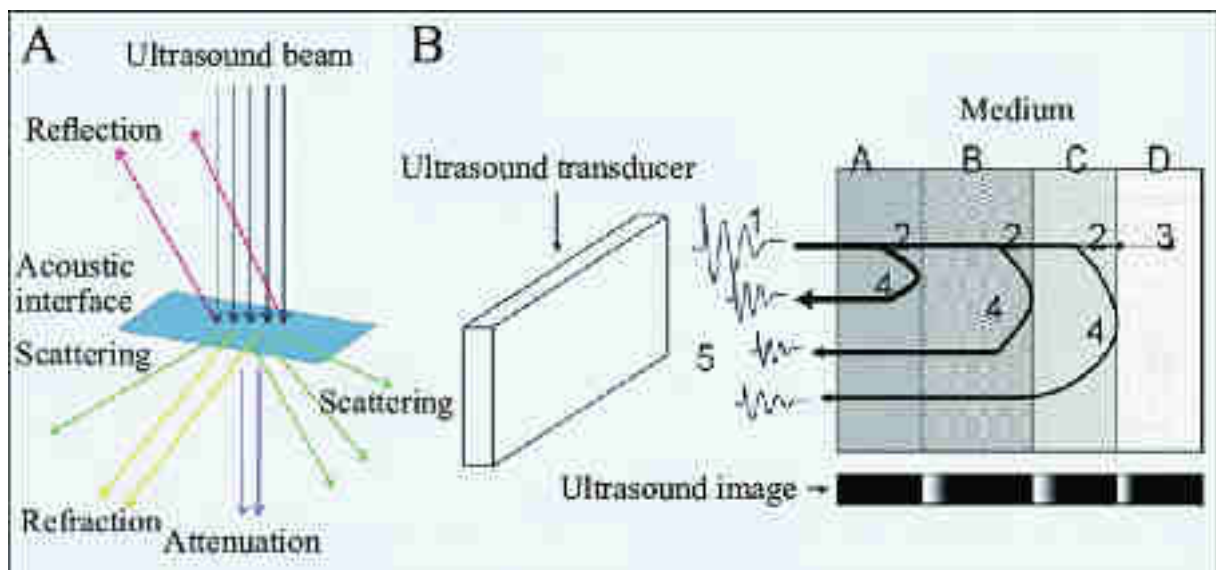
Les ultrasons sont des ondes sonores de hautes fréquences (> 20 000 Hertz) non perceptibles par l'oreille humaine. (73) Ils sont couramment utilisés dans d'autres domaines que l'industrie pharmaceutique : dans l'aéronautique, pour la détection des sous-marins et dans le domaine médical pour observer des organes comme le cœur ou encore observer un fœtus.(74)

L'échographie est la technique la plus connue qui repose sur l'utilisation des ultrasons. À l'aide d'un émetteur et d'un récepteur, les ondes ultrasoniques émises se propagent dans le milieu et, lorsqu'elles rencontrent un obstacle, un signal par réflexion est renvoyé au récepteur générant une image. Ce signal est en fonction de la distance et de l'impédance acoustique, c'est-à-dire la résistance du milieu au passage de l'onde. (73) Ces signaux mettent en jeu des propriétés physiques propres aux ondes ultrasoniques telles que la réflexion, la réfraction, la diffusion et l'atténuation.(75)



Les images retranscrites sont en noir et blanc et en nuances de gris. La différence subsiste dans la capacité des milieux et obstacles à laisser passer les ondes. Les zones noires indiquent un passage des ondes, des milieux liquides par exemple. Les zones blanches quant à elles, indiquent des milieux denses, des structures bloquant les ondes tels que des os. Enfin, les zones grisées sont des milieux inhomogènes, qui réfléchissent partiellement les ondes. (78)

Cette méthode est aussi appliquée à la détection des biofilms. En effet, comme il est possible d'obtenir une transcription des fonds marins, il est possible de détecter les aspérités d'une portion d'un circuit d'eau. Plus spécifiquement, mesurer l'épaisseur d'un biofilm est réalisable grâce à ce système de détection. (76)

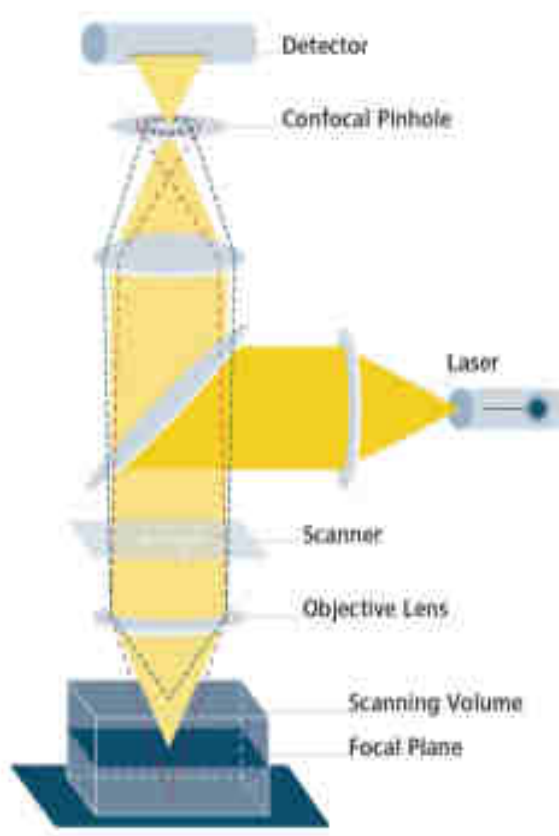


*Figure 14 : Principe des ultrasons issue de (74)*

## 5. Microscopies

Plusieurs techniques de microscopies permettent la visualisation de la structure et de la composition microbienne des biofilms pouvant même aller jusqu'à l'étude de la matrice.(44)

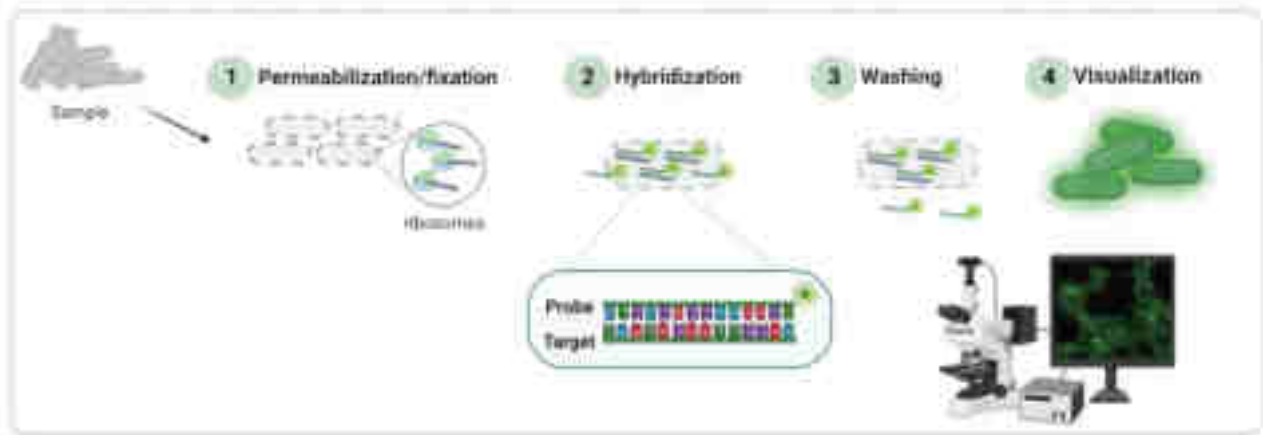
La microscopie confocale à balayage laser permet d'observer des structures épaisses ou en relief. L'utilisation d'un laser, d'une lentille, d'un sténopé (petit trou faisant office d'objectif photographique), de miroirs et de photomultiplicateurs permet de réaliser des images de très faibles profondeurs de champ, obtenant ainsi une reconstruction tridimensionnelle de ce qui est observé. (77)



*Figure 15 : Principe de la microscopie confocale laser à balayage (78)*

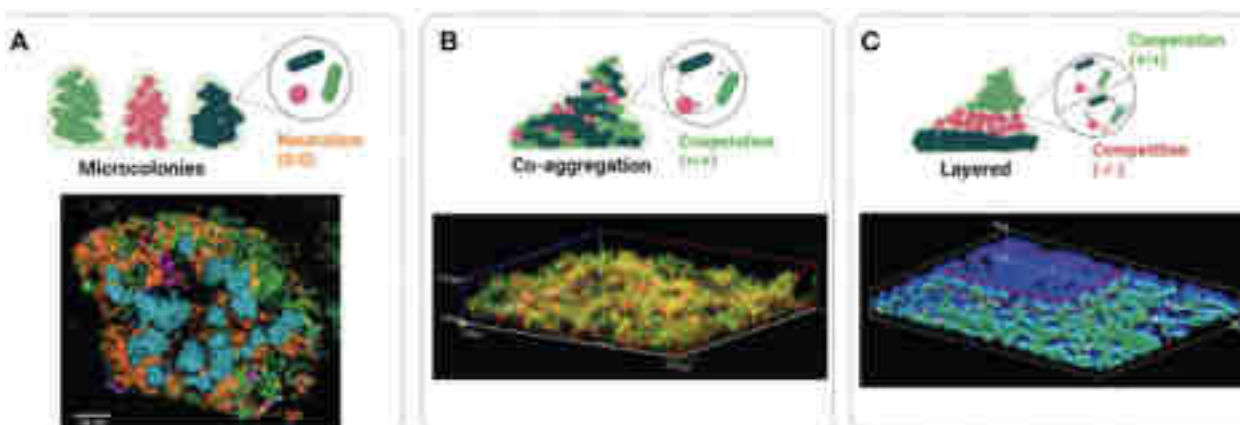
En associant la microscopie confocale à balayage laser à la technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), il est par exemple possible de visualiser des biofilms sans altérer leur conformation tridimensionnelle. Cette technique se base sur l'utilisation de sondes à ADN fluorescentes qui s'hybrident avec des cibles d'acide nucléiques (par exemple, ADN, ARNm, ARNr) à l'intérieur des cellules ou des tissus.(79)

Pour se faire, l'échantillon est fixé et perméabilisé pour stabiliser les cellules et faire entrer la sonde fluorescente à travers les parois cellulaires (étape 1). Ensuite, l'hybridation se fait entre les séquences d'acides nucléiques cibles et les sondes fluorescentes (étape 2). L'élimination des sondes en excès est réalisée par lavage (étape 3). L'analyse de l'échantillon est effectuée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser pour déterminer la distribution spatiale de la population du biofilm (étape 4).



*Figure 16 : Principe de la méthode FISH issu et adapté de (79) :  
la méthode FISH comporte 4 étapes, une étape de perméabilisation/fixation,  
puis l'hybridation, le lavage et la visualisation microscopique*

La microscopie confocale à balayage laser couplée à la technologie FISH permet ainsi de distinguer différents types de conformation spatiale des biofilms mais également la multiplicité d'espèces bactériennes qui s'y trouvent.(79) La Figure 17 montre par exemple trois conformations possibles au sein d'un biofilm. La première conformation (A) renseigne sur un état neutre, c'est-à-dire où les microcolonies sont indépendantes. A contrario, la seconde conformation (B) met en évidence un biofilm avec une co-agrégation bactérienne ce qui montre qu'une coopération bactérienne peut subsister entre différentes espèces bactériennes. La troisième conformation (C) met en avant un biofilm en plusieurs couches séparées distinctement, créant alors de la coopérativité mais également de la compétition inter-espèces. Ce qui diffère entre la conformation A et C est l'agencement de la matrice, qui permet (A) ou non (C) l'isolement entre les différentes espèces. (79)



*Figure 17 : Différentes conformations bactériennes au sein d'un biofilm d'après (79)*

### III. Élimination des biofilms

#### 1. Ozone

L'ozone est composé de 3 molécules d'oxygène. C'est un gaz qui, à pression atmosphérique, peut se dissoudre partiellement dans l'eau. (80) Sa capacité à être un fort oxydant, constitue une propriété intéressante à exploiter pour l'élimination des biofilms.(81)(82) En effet, il permet d'oxyder rapidement les polysaccharides qui représentent le ciment de la matrice du biofilm, limitant ainsi l'adhérence aux surfaces. De plus, les parois des bactéries seront aussi sensibles à l'oxydation, qui cause la rupture des parois et donc la mort cellulaire. Dans l'eau, l'ozone se décompose en radicaux – OH réactifs. (83) L'ozone est couramment utilisé puisqu'il se décompose en oxygène, un sous-produit non toxique.(84)

#### 2. Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène, de formule  $H_2O_2$ , se décompose facilement en oxygène et en eau et ne génère donc pas non plus de sous-produits toxiques lors de sa décomposition. Cette molécule fortement oxydante présente des propriétés bactéricides, en produisant des radicaux libres oxygénés. Ces radicaux réagissent alors les composants cellulaires tels que protéines, lipides et acides nucléiques.(85)

#### 3. Acide peracétique

L'acide peracétique est un liquide qui résulte du mélange d'acide acétique et de peroxyde d'hydrogène en solution aqueuse. L'acide peracétique est également un oxydant puissant. Dans l'eau, il se décompose en eau, en oxygène et en dioxyde de carbone. Il n'y a donc pas de production de sous-produits toxiques. (86) Avec sa qualité d'oxydant par génération de radicaux hydroxyl (87), il est capable d'oxyder les polysaccharides du biofilm et la membrane des bactéries qui s'y trouvent. (88)

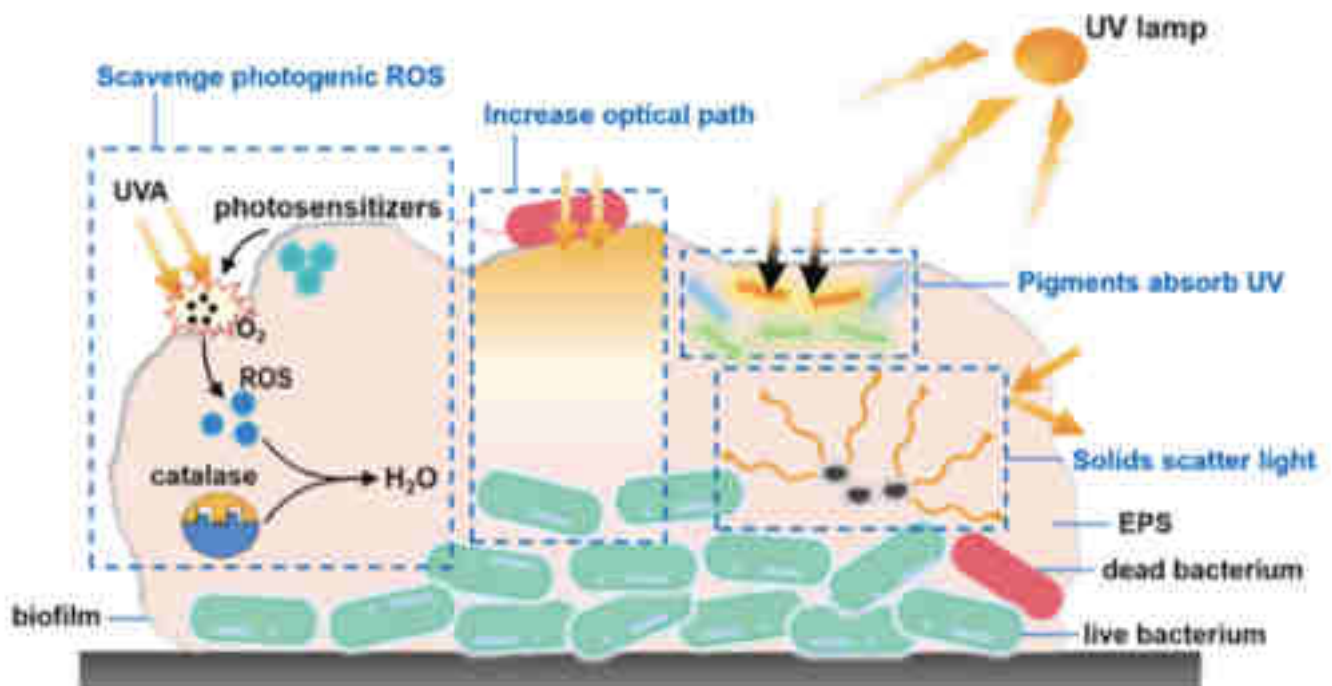
#### 4. Composés chlorés

Les composés chlorés sont également des oxydants puissants. Lorsqu'ils sont en contact de l'eau, il se forme de l'acide hypochloreux et des ions hypochlorite. Ces composés constituent du chlore libre, responsable de l'action désinfectante. (89) En effet, l'acide hypochloreux cible et détruit certaines enzymes, comme les essentielles pour la vie et le développement des bactéries.(90) Par exemple, chez *Escherichia coli*, l'aldolase est une enzyme nécessaire au métabolisme des glucides et est ciblée par les produits chlorés. (91)

## 5. Ultraviolets (UV)

Les ultraviolets sont des rayons qui proviennent de sources naturelles telles que le soleil, ou de sources artificielles. Ces rayons s'étendent entre 100 et 400 nm et sont divisés en 3 catégories ; les UVA, les UVB et les UVC. Ce qui les différencie est leur longueur d'onde et donc leur énergie. Les UVC sont les plus énergétiques, c'est donc ce type de rayon qui est donc utilisé.(92) En effet, les UV causent des dommages à l'ADN et, en rentrant en contact avec les bactéries, le rayonnement traverse la membrane pour ensuite atteindre l'ADN et causer des dommages. Ces dommages vont ainsi empêcher l'organisme de se reproduire, par destruction de son matériel génétique. Cette technique permet donc de stopper la reproduction des micro-organismes. Les UV sont également utilisés pour éliminer les biofilms des circuits d'eau. Ils sont néanmoins le plus souvent associés à une autre technique comme l'utilisation du peroxyde d'hydrogène.(93) L'avantage de cette technique est qu'il n'y a pas risques de création de sous-produits toxiques ou réactifs.(94)

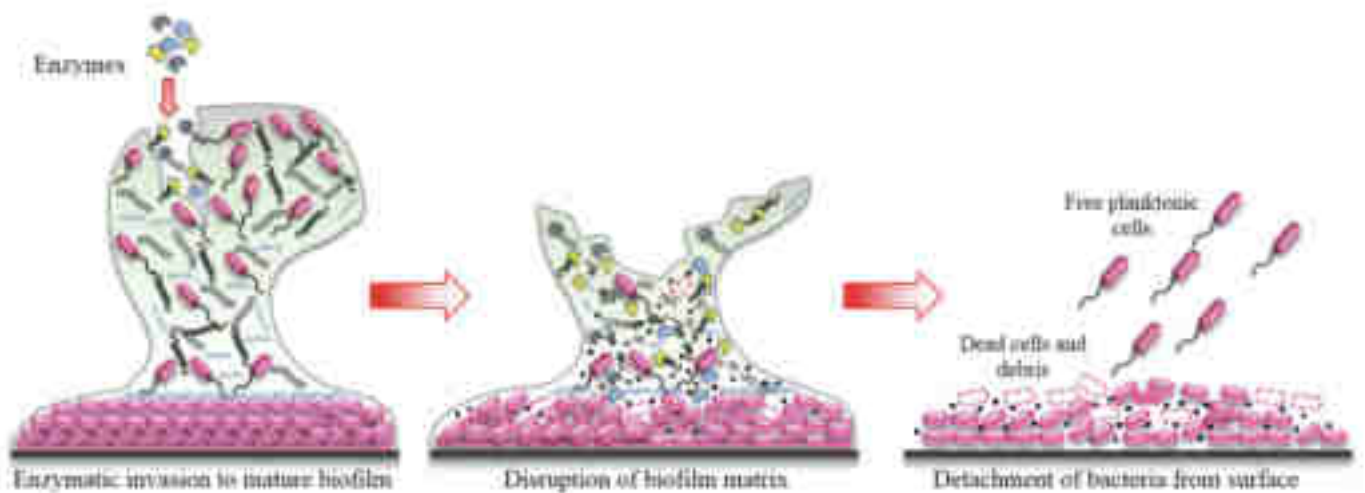
Néanmoins, les biofilms peuvent s'avérer plus résistants aux UV que des bactéries planctoniques. Cela est dû à la structure même du biofilm et plus particulièrement à la matrice exopolysaccharidique (EPS). (93) Les différents mécanismes de résistances tels que l'augmentation de la longueur du trajet de l'irradiation incidente, le piégeage des ROS (Reactive Oxygen Species), les facteurs de protection absorbant les UV (pigments) et la diffusion de la lumière causée par des particules sont repris en Figure 18.



*Figure 18 : Mécanismes de résistance du biofilm face aux UV d'après (93)*

## 6. Méthode enzymatique

Les enzymes sont des protéines présentes dans les cellules. Elles ont pour fonction de faciliter des réactions chimiques. C'est par exemple le cas d'une enzyme, la N-acetylmuramide glycanohydrolase, capable d'hydrolyser la matrice polysaccharidique du biofilm. En effet, l'utilisation de cette enzyme permet de « dissoudre » le biofilm, réduisant son adhérence et permettant son détachement.(95) Ainsi, les bactéries qui se retrouvent sans cette protection, sont alors plus vulnérables aux désinfectants. Néanmoins, cette méthode n'a pas d'effet bactéricide (96) et il est donc nécessaire de combiner cette technique avec une méthode dite conventionnelle à base de désinfectants chimiques pour être efficace. (97)



*Figure 19 : Action des enzymes sur la matrice du biofilm d'après (98) :*

*les enzymes dégradent la matrice, perturbant la matrice*  
*et permettant ainsi le détachement des bactéries de la surface*

## 7. Perturbation du flux d'eau

Dans un fluide, les particules se déplacent selon une oscillation naturelle. Si une autre oscillation est introduite dans le système, deux possibilités existent. La première est que les deux ondes s'annulent, l'oscillation résultante est alors nulle. La seconde possibilité est que l'oscillation ajoutée vienne renforcer la première augmentant ainsi la solubilité des particules et réduisant ainsi le dépôt, c'est l'oscillation active.(99) C'est ce que le système Merus propose. Il s'agit d'un anneau à placer autour de la conduite d'eau et qui transmet donc une oscillation active de l'eau. Ce phénomène va donc augmenter la solubilité des particules et des dépôts qui seront alors remis en suspension afin d'être éliminés. La création de biofilms est donc limitée.

## IV. Questionnaire : expériences de terrain ; détection et élimination des biofilms

### 1. Matériel et méthode

#### A. Objectif

L'objectif principal de ce questionnaire est de recueillir des informations quant à la détection et l'élimination des biofilms au sein des industries de santé. Ces informations vont permettre de rendre compte des pratiques réalisées sur le terrain, en fonction des ressources de chaque entreprise telles que les coûts, les installations, le type de production...

#### B. Champ d'application

Ce questionnaire est dédié aux industriels de santé au sens large, que ce soit des industries pharmaceutiques, agro-alimentaires ou encore aux centres hospitaliers.

#### C. Recueil des réponses

Le recueil des réponses a été effectué via un questionnaire au format Google Forms, entièrement anonyme à réponses ouvertes. L'extraction s'est faite via un fichier Excel reporté en annexe.

### 2. Résultats

Le questionnaire est composé de 2 parties, avec 4 questions par partie. La première partie est consacrée à la détection des biofilms et la seconde à l'élimination des biofilms. Le nombre de répondants est de 12 personnes.

L'analyse des résultats dans cette partie consiste exclusivement à synthétiser les réponses données, à les contextualiser et à les clarifier. La partie discussion de ce manuscrit est dédiée à l'interprétation de ces réponses, en les confrontant avec la bibliographie et avec mon expérience de terrain.

#### A. Partie 1 : détection des biofilms

Question n°1 : “Comment la détection des biofilms est-elle planifiée (processus ponctuel, régulier, global et/ou précoce) ? Pourquoi ?”

Cette question a pour objectif de mettre en évidence si la détection des biofilms est un processus à part entière d'une entreprise et ainsi de faire ressortir ou non l'intérêt plus ou moins important des biofilms au sein des entreprises.

Pour tous les répondants, je constate que la détection directe des biofilms ne fait pas partie d'un processus planifié. Néanmoins, pour la majorité des répondants, des monitorings de l'eau sont effectués à intervalles réguliers ce qui peut mettre en évidence de façon indirecte une contamination par biofilm. Ces monitorings incluent la mesure du COT (carbone organique total), le dosage des endotoxines et les analyses DGAT (Dénombrement des Germes Aérobie Total).

De plus, pour certains, une investigation poussée est menée dès lors de résultats anormalement élevés et redondants, ou lorsque des bactéries filmogènes sont retrouvées.

Ce sont donc ces analyses des eaux qui vont mener ou non à réaliser une investigation sur une éventuelle contamination des réseaux d'eau par biofilm.

Par ailleurs, pour un répondant, lors d'une intervention sur un circuit d'eau (changement de portions de tuyaux, de vannes) les anciens éléments sont examinés afin de vérifier l'absence visuelle de biofilm.

#### Question n°2 : Quelle(s) méthode(s) utilisez-vous actuellement pour détecter ces biofilms ?

Cette question a pour objectif de rendre compte des méthodes utilisées pour détecter les biofilms sur le terrain.

Je constate que les biofilms ne sont pas détectés de façon directe, mais plutôt de façon indirecte : *« Actuellement on n'a pas de méthode précise pour détecter les biofilms. On les suppose via les résultats microbiologiques. »*. Les méthodes de détection utilisées passent par la mise en évidence de contamination des circuits d'eau, par prélèvement d'eau pour analyse. Les analyses majoritairement effectuées sont la mesure du COT (carbone organique total), le dosage des endotoxines et l'analyse DGAT.

Ces méthodes mettent en évidence une éventuelle contamination indirecte par biofilms du circuit. Pour s'en assurer, en cas de suspicion de biofilms, une endoscopie du réseau est effectuée en ayant déterminé au préalable des points de rétention potentiels, c'est ce que propose un répondant.

Des prélèvements de surfaces et des analyses par microscopie sont également des méthodes appliquées pour mettre en évidence de façon directe un biofilm.



Question n°3 : A quelle(s) difficulté(s) faites-vous face quant à la détection des biofilms ?

Cette question a pour objectif de faire ressortir les difficultés rencontrées quant à la détection des biofilms.

Les réseaux d'eau sont des circuits fermés et je constate donc que les difficultés rencontrées par certains sont le manque de visibilité de l'intérieur du réseau d'eau (observation d'un éventuel biofilm à l'œil nu) et l'impossibilité de réaliser des prélèvements directs, comme le souligne cette réponse : « *Pas d'observation de l'intérieur du réseau possible donc il est difficile de visualiser le biofilm ou réaliser des prélèvements supplémentaires (écouvillonnage).* ».

De plus, localiser le biofilm dans un réseau vaste et complexe représente aussi source de difficultés. Identifier clairement une contamination par biofilm est également un obstacle puisqu'un biofilm ne relargue pas de marqueurs en continu ce qui rend l'interprétation moins évidente.

La réalisation d'un prélèvement et la visualisation d'un éventuel biofilm sont donc les 2 principales difficultés rencontrées sur le terrain.

Question n°4 : Qu'envisageriez-vous pour dépasser ces difficultés ou optimiser cette détection (méthodes alternatives...) ?

Cette question ouverte a pour objectif de mettre en évidence les méthodes alternatives qui peuvent d'ores et déjà exister dans les entreprises pour optimiser la détection des biofilms.

Je constate que pour optimiser la détection des biofilms ou avoir recours à des méthodes alternatives n'est pas un sujet facile. Certains pensent que la mise en place de capteur à détection continu ou d'utiliser des méthodes moins conventionnelles telle que la cytométrie en phase solide peut être une solution. Les professionnels aimeraient avoir recours à un prestataire plus souvent, pour permettre un contrôle plus régulier avec une expertise spécifique.

Enfin, la prévention de la contamination apparaît également comme une méthode, en optimisant le design du réseau et des équipements pour limiter les points de rétention et en choisissant des matériaux limitant le risque de croissance microbienne.

## B. Partie 2 : élimination des biofilms

Question n°5 : Comment l'élimination des biofilms est-elle planifiée (processus ponctuel, régulier, global et/ou précoce) ? Pourquoi ?

Cette question a pour objectif de mettre en évidence si l'élimination des biofilms est un processus à part entière d'une entreprise et ainsi de faire ressortir ou non l'intérêt plus ou moins important des biofilms au sein des entreprises.

Pour tous les répondants, il n'y a pas de planification concernant l'élimination des biofilms. La prévention est le maître mot de tous les répondants. Des processus de désinfection sont en place (ozonation, soude).

Question n°6 : Quelle(s) méthode(s) utilisez-vous actuellement pour éliminer ces biofilms ?

Cette question a pour objectif de rendre compte des méthodes utilisées pour éliminer les biofilms sur le terrain.

La désinfection est bien entendu la méthode la plus utilisée, il en existe plusieurs. Les méthodes recueillies sont à la fois des méthodes chimiques (pour la majorité des répondants) et thermiques. Parmi celles-ci, une désinfection par rayon UV, par ozonation, par chloration, par utilisation de peroxyde d'hydrogène sont des méthodes proposées. Une autre méthode proposée est la filtration stérilisante à l'aide de filtres à 0,2 µm, qui n'est pas une méthode de désinfection à proprement parler.

Une méthode mise enfin sur le nettoyage plutôt que la désinfection : « *Nettoyage enzymatique (CIP et COP) suivi d'un nettoyage avec un produit alcalin puis un produit acide.* ».

Question n°7 : A quelle(s) difficulté(s) faites-vous face quant à l'élimination des biofilms ?

Cette question a pour objectif de faire ressortir les difficultés rencontrées quant à l'élimination des biofilms sur le terrain et ainsi dimensionner l'ampleur des problèmes qu'ils peuvent causer.

Je constate que l'élimination des biofilms demande du temps et des coûts encore plus conséquents comme le souligne un répondant : « *Activités d'élimination nécessite des temps d'arrêt importants de l'installation, ainsi que des coûts importants.* ».

De plus, d'autres difficultés rencontrées sont la résistance du biofilm quant à la désinfection chimique ainsi que la récurrence des contaminations (retour à conformité après traitement mais recontamination quasi immédiate si l'action n'est pas suffisante et que la détection est non immédiate) ce qui engendre du temps et des coûts plus importants.

La durée de traitement, l'éventuelle persistance de résidus et l'impossibilité d'utiliser une méthode thermique sont également des problèmes cités.

Le fait que les machines qui ne sont pas adaptées pour les nettoyages enzymatiques (non recommandés par les fabricants d'équipements) apparaît également comme une difficulté pour un répondant.

Question n°8 : Qu'envisageriez-vous pour dépasser ces difficultés ou optimiser cette élimination (méthodes alternatives...) ?

Cette question ouverte a pour objectif de mettre en évidence les méthodes alternatives qui peuvent d'ores et déjà exister dans les entreprises pour optimiser l'élimination des biofilms.

Parmi les réponses, très peu présentent des solutions ou méthodes alternatives comme le témoignent ces deux extraits : « *Pas de solutions envisagées à ce jour.* » ou encore « *Aucune idée (si ce n'est qu'on essaie d'alterner les produits chimiques utilisés pour nos nettoyages)* ». Néanmoins, certains répondants proposent d'optimiser la désinfection avec une méthode de stérilisation par vapeur d'eau chauffée à 121°C, ce qui peut être un moyen de dépasser les difficultés relatives à l'élimination des biofilms. Par ailleurs, le coût d'investissement est très élevé pour mettre cette méthode en place. La réalisation d'une cartographie des réseaux d'eau et la recherche de produits alternatifs quant à l'utilisation de produits chimiques comme la soude qui induit une corrosion et donc une usure prématurée des équipements est aussi une alternative recueillie.

## V. Discussion

### 1. Détection des biofilms

Les biofilms ne sont pas détectés au sens strict du terme dans les industries de santé puisque la grande majorité des méthodes décrites dans ce manuscrit et retrouvées sur le terrain, mettent uniquement en évidence une contamination bactérienne des réseaux d'eau sans forcément une colonisation bactérienne sous forme de biofilms. Ainsi, les biofilms ne sont pas envisagés en premier lieu lorsqu'une contamination microbiologique de l'eau est mise en évidence.

En effet, lors d'une contamination microbiologique de l'eau, des hypothèses sont émises quant à la source de cette contamination comme par exemple l'apport d'une contamination exogène lors du prélèvement de l'eau et/ou lors de son analyse. De plus, pour toutes les entreprises interrogées, il n'y pas de planification dans la détection spécifique de biofilms. De ce fait, c'est seulement lorsque ces contaminations de l'eau deviennent récurrentes que des investigations sont menées. C'est à cet instant que le terme biofilm apparaît et c'est souvent trop tard, le biofilm est déjà installé. Quant à la fréquence d'apparition des biofilms et des problèmes associés, il est difficile de l'évaluer. En effet, la présence de contaminations microbiennes dans l'eau ne signifie pas forcément présence de biofilms et inversement, puisque l'absence de contaminations peut tout de même indiquer la présence de biofilms dans une phase de non relargage de bactéries.

Ainsi, toutes les recherches menées et récoltées sur le sujet mettent en évidence un réel manque de visibilité quant à la présence avérée de biofilms dans un circuit d'eau. En effet, il est difficile de les détecter de façon directe, la majorité des tests sont des tests reflétant une contamination indirecte du circuit d'eau, qui peut être transitoire ou installée, comme dans le cas d'un biofilm. Cette difficulté est principalement liée à l'infrastructure même des circuits d'eau, qui sont des circuits fermés, opaques et donc inaccessibles en routine.

Cette détection indirecte est réalisée majoritairement par le contrôle de l'eau circulant dans les circuits avec des analyses associées telles que la mesure du carbone organique total (COT), des endotoxines, les DGAT et la conductivité. C'est l'association de ces analyses qui est privilégiée sur le terrain. Sa standardisation, sa simplicité et son faible coût de mise en place expliquent ce choix. Lorsque ces analyses sortent positives, cela ne signifie pas qu'un biofilm est présent, toute la complexité réside donc dans la détection avérée de biofilms.

Pour pallier cela, en cas de suspicion de biofilms, une endoscopie du réseau peut être effectuée en ayant déterminé au préalable les points critiques de rétention potentiels et c'est ce qui est effectué sur le terrain. Cette technique permet une visualisation directe d'un éventuel biofilm et ainsi d'effectuer un traitement en conséquence.

D'autres méthodes de détection citées en amont dans le manuscrit ne semblent pas correspondre à ce qui peut être fait sur le terrain, c'est par exemple le cas de la microscopie. La microscopie dans l'étude des biofilms est courante mais orientée sur les biofilms de surfaces accessibles. Pour observer les biofilms dans un circuit d'eau, un démantèlement d'une partie du système est à effectuer afin de dégager une surface interne d'un conduit.

Néanmoins, ces tests ne sont pas suffisants pour se rendre compte de la contamination réelle d'un circuit d'eau. En effet, certaines bactéries ne se développent pas sur les milieux de culture utilisés, c'est le cas des VBNC (bactéries viables non cultivables) ce qui sous-estimerait le résultat rendu lors de l'analyse DGAT. De plus, les résultats sont obtenus plusieurs jours après le lancement du test, retardant ainsi l'utilisation de l'eau. Afin de remédier à cela, certaines méthodes présentées dans ce manuscrit pourraient être appliquées pour analyser des prélèvements d'eau qui reflèteraient la contamination réelle comme la cytométrie en flux. Avec cette méthode, les bactéries pourraient être comptées en incluant celles qui ne se développent pas sur les milieux de culture gélosés et ainsi rendre un résultat au plus proche de la réalité. (62)

Plusieurs semaines peuvent s'avérer nécessaires pour s'assurer de la présence d'un biofilm puisque les bactéries du biofilm ne sont pas relarguées en continu. Les résultats des analyses d'eau seront donc conformes puis non conformes par intermittence ce qui rend difficile de statuer sur une décision de traitement du réseau d'eau. Ainsi, la prévention de l'installation des biofilms au sein de circuits d'eau est indispensable et c'est ce qui est effectivement fait sur le terrain pour tous les répondants.

## 2. Élimination des biofilms

Après investigations, lorsque la présence de biofilms est fortement probable ou avérée, en fonction des méthodes de détection utilisées, les tentatives d'élimination de ces derniers sont alors inévitables et indispensables afin de retrouver une eau de qualité conformes les exigences réglementaires quant à son utilisation.

Les diverses techniques d'élimination citées et récoltées dans ce manuscrit sont nombreuses, laissant un large choix aux industriels de choisir celle qui convient le mieux en fonction de leurs ressources. La multiplicité de techniques permet également de combiner ou d'alterner les techniques en cas d'échec. En effet, certaines techniques ne sont pas toujours efficaces, les biofilms sont des structures résistantes tout comme les bactéries qui les composent. Ces dernières ont la capacité d'une part d'être protégées par la matrice du biofilm et d'autre part, d'acquérir une résistance accrue face aux différents agents d'élimination.

De plus, l'efficacité de différentes méthodes varie d'une entreprise à l'autre puisque tous les biofilms sont différents dans leur structure en fonction de leur ancienneté et de leur composition microbienne. Les techniques d'élimination citées dans le manuscrit se retrouvent effectivement sur le terrain avec l'utilisation de l'ozone, de produits chlorés, des UV et des enzymes. L'utilisation de ces produits est faite sans y apporter une action mécanique comme cela pourrait être effectué sur des surfaces contaminées par des biofilms mais accessibles au nettoyage manuel. Cette absence d'action mécanique est une difficulté supplémentaire puisqu'elle permettrait de casser la matrice et ainsi laisser pénétrer les désinfectants au cœur du biofilms pour atteindre les bactéries. Pour se rapprocher de cette action, utiliser des produits enzymatiques apparaît comme une solution envisageable puisque les enzymes sont capables de dissoudre la matrice des biofilms. (97)

Parallèlement, la réduction des coûts est également un critère à prendre en compte. En effet, les produits utilisés sont coûteux et la difficulté d'élimination des biofilms entraîne une consommation importante de ces produits. Ainsi, il est nécessaire de mettre l'accent sur la prévention de la contamination et cela dès l'installation d'un nouveau circuit d'eau lorsque c'est possible. Néanmoins, les solutions enzymatiques sont plus chères que les produits chimiques standards ce qui peut être en frein pour certaines industries.(100)

À l'heure de la réduction de la pollution environnementale, des produits plus « propres » sont à envisager. Il faudrait ainsi limiter l'utilisation de produits chimiques tels que la soude ou de produits chlorés au profit de solutions alternatives telles que l'utilisation des produits enzymatiques, de l'ozone ou des rayons UV. De même, il serait judicieux de limiter les produits corrosifs tels que la soude permet également de protéger les réseaux contre la corrosion qui se développe au fil du temps et ainsi préserver les circuits d'eau au fil des années.

Des technologies innovantes sont actuellement en développement contre des infections à biofilms chez des patients et peuvent être transposables vers la lutte anti-biofilms dans les industries, comme la phagothérapie. Cette technique utilise des bactériophages, ce sont des virus naturels retrouvés dans l'environnement et qui ont la capacité d'infecter des bactéries. (100) Dans la majorité des cas, chaque bactériophage est spécifique d'une seule espèce bactérienne. (101) Les bactériophages injectent leur ADN et forcent la cellule bactérienne à produire le génome et les structures du bactériophage. Lorsque les bactériophages sont complets, ils lysent les cellules bactériennes, ce qui signifie que l'infection par un bactériophage peut donc détruire toute la colonie bactérienne impliquée. (100) C'est donc une technique d'élimination ciblée qui pourrait apparaître dans les années futures.

La complexité d'élimination d'un biofilm souligne davantage la nécessité de mettre en place de nouvelles techniques comme la phagothérapie mais également de souligner l'importance de la prévention contre l'apparition de ces biofilms. Des entretiens préventifs et planifiés des circuits d'eau peuvent être prévus, avec par exemple une ozonisation hebdomadaire. Une connaissance technique sur les fondamentaux de la bactériologie est indispensable afin de comprendre et d'interpréter les différentes analyses au-delà des valeurs numériques rendues. En effet, une analyse des germes ayant poussé lors d'un dénombrement permet d'orienter sur la présence d'un biofilm ou non. Ainsi, la connaissance bactériologique est cruciale dans l'interprétations des diverses analyses effectuées et donc sur la décision de traitement.

Par ailleurs, le nombre de réponses obtenues ne permet pas de généraliser certaines méthodes, autant pour la détection que pour l'élimination. Un échantillonnage plus grand permettrait de se rendre de compte de façon plus juste des pratiques effectuées sur le terrain ainsi que les technologies innovantes qui peuvent être mises en place dans certaines industries de façon indépendante.

Enfin, en tant que future pharmacienne, je pense que tel des médicaments agissant sur des cibles, l'élimination des biofilms doit également être ciblée, que ce soit la matrice et les différents germes impliqués. De cette façon, agir de façon synergique en ciblant la matrice et les bactéries en même temps semble être un bon compromis avec par exemple l'utilisation d'enzymes pour déstructurer la matrice puis d'un désinfectant ciblant les bactéries.

### 3. Implication de ce mémoire pour les pharmaciens

En tant que future pharmacienne je pense qu'il est important de comprendre les enjeux autour de la question des biofilms. Une compréhension de leur composition et organisation microbienne est nécessaire afin d'agir en pleine connaissance de cause lorsque cela est requis. Les biofilms colonisent de nombreux milieux, ils sont un véritable problème dans de multiples domaines de la santé. Le pharmacien y est ainsi confronté de façon plus ou moins directe et peut donc être amené à prendre des décisions à ce sujet.

Les biofilms peuvent être présents dans les circuits d'eau des hôpitaux mais aussi sur des surfaces telles que des cathéters, des sondes urinaires, des endoscopes, des prothèses... Ces surfaces sont critiques parce qu'elles sont en contact direct avec le patient et ainsi représentent des vecteurs lors des infections associées aux soins.

Les techniques d'élimination des biofilms sur surfaces diffèrent de celles utilisées dans des circuits d'eau et cela est dû principalement à la différence de conformation et d'accessibilité des surfaces. Par exemple, il est possible d'inhiber la première étape dans la formation d'un biofilm en ciblant les adhésines bactériennes empêchant ainsi la fixation bactérienne et le développement de biofilms. (3)

En milieu hospitalier, les biofilms sont un sujet connu et courant, sources d'inquiétudes parfois. Le service d'hygiène hospitalière et les pharmaciens hospitaliers associés sont en première ligne face à la lutte contre les biofilms dans l'environnement. Les biofilms sont aussi présents hors des circuits d'eau. L'eau est retrouvée à plusieurs niveaux dans le milieu hospitalier, dans les zones techniques comme la laverie, où les différents matériels sont nettoyés, désinfectés ou stérilisés mais également dans des zones plus conventionnelles telles les chambres avec les robinets et des douches. L'eau est donc un vecteur de contamination important pour les patients, notamment ceux dont le système immunitaire est affaibli, les rendant ainsi plus vulnérables aux infections.

De la même manière qu'une résistance aux désinfectants peut exister, une résistance vis-à-vis des antibiotiques peut se manifester selon la souche considérée. Ce phénomène est acquis et se transmet par exemple par des mécanismes de transfert horizontal de gènes de résistances aux antibiotiques.(102) Ces modifications génétiques par transferts horizontaux de gènes ou par mutations spontanées sont bien connues pour leur implication dans la résistance aux antibiotiques chez certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus*.(103) C'est pourquoi les personnels de santé s'attachent le plus souvent à identifier voir comprendre l'apparition de ces souches résistantes, afin d'adapter la prise en soin des patients.

Mon travail suggère que dans l'industrie pharmaceutique, démarche réflexive qui consiste à chercher les causes de la résistance bactérienne aux désinfectants n'est pas répandue. Une vigilance accrue devrait pourtant être apportée vis-à-vis des germes qui se développent dans les circuits d'eau, par la compréhension des résistances d'origine génétique qui peuvent émerger. Cette démarche permettrait d'adapter les traitements d'élimination tout en économisant des produits désinfectants, de l'argent et du temps. En effet, une contamination par biofilms et des résultats microbiologiques positifs diffèrent la mise sur le marché des médicaments. Les pharmaciens industriels sont impliqués à différents niveaux au sein de l'entreprise, entre la production, le contrôle qualité et l'assurance qualité et à ce titre ils ont un rôle central pour initier et mener cette démarche réflexive.



En milieu officinal, les pharmaciens officinaux peuvent également être concernés de façon directe par les biofilms. En effet, des préparations magistrales et officinales sont effectuées dans certaines officines et impliquent l'utilisation de l'eau. Cette eau peut déjà être conditionnée et donc être utilisée de façon à ce qu'elle respecte tous les critères attendus pour une certaine qualité d'eau (eau ppi ou eau purifiée). Lorsque ce n'est pas le cas, elle peut également provenir d'un circuit d'eau et donc nécessiter des contrôles. D'après les BPP (Bonnes Pratiques de Préparation), les circuits d'eau doivent également suivre des processus de qualification, contrôle et maintenance.(104) Ainsi, des problèmes de contaminations par biofilms ne sont pas exclus. Le pharmacien d'officine n'est peut-être pas à même de se rendre compte d'une contamination par biofilms.

L'utilisation d'une eau déjà conditionnée permet généralement de pallier cet obstacle si la production, le stockage et la manipulation de cette eau sont appropriés. De façon indirecte, les pharmaciens officinaux sont concernés par l'invasion de biofilms dans les circuits d'eau des industries pharmaceutiques. La production d'une eau utilisée en tant qu'adjuvant dans des médicaments ne se situe qu'au début du processus de commercialisation et de dispensation en officine.

De façon générale, l'eau rentre dans la composition de nombreux médicaments, elle est donc contrôlée en amont afin d'être conforme aux spécifications afin de l'incorporer dans un processus de fabrication. Ainsi, des contaminations des circuits d'eau par des biofilms peuvent donc mettre en péril la production, pouvant entraîner un arrêt complet d'une ligne de production. Cet arrêt peut durer plusieurs jours ou semaines, nécessaire pour effectuer plusieurs cycles de nettoyage/désinfection jusqu'au retour d'une eau conforme aux spécifications.

Les pharmaciens officinaux font face à de nombreuses ruptures et pénuries de certaines spécialités médicamenteuses, notamment des antibiotiques et formulations pédiatriques. Ces formulations pédiatriques sont principalement sous forme de sirop afin de faciliter la prise médicamenteuse des jeunes enfants. Ce sont des préparations constituées de principes actifs et d'excipients, l'eau étant un des excipients majoritaires. Par exemple, la suspension buvable TRILEPTAL® 60mg/ml, un antiépileptique, contient de l'eau purifiée dans sa préparation.

De ce fait, il est tout à fait envisageable qu'une contamination des circuits d'eau puisse retarder la production de ces types de médicaments, étant une cause parmi d'autres de ruptures de médicaments.

## VI. Conclusion et perspectives

Les biofilms sont bel et bien importants à prendre en compte dans l'industrie pharmaceutique. En effet, la détection parfois complexe et souvent de façon indirecte, rend difficile l'interprétation des analyses et donc des décisions qui en découlent. L'élimination des biofilms est également délicate et chronophage. Ainsi, la prévention de l'apparition des biofilms apparaît donc comme une solution efficace de lutte contre leur installation dans les circuits d'eau. Cette prévention passe par un point non négligeable : la qualification des circuits d'eau.

La qualification des circuits d'eau commence dès la conception. Des règles de bases sont à respecter telles que l'absence de bras mort ou d'endroits propices à la stagnation de l'eau.

Les types de matériaux utilisés lors de la construction d'un nouveau système de circuits d'eau sont à prendre en compte. Les surfaces rugueuses sont proscrites, en effet ce sont des pièges à bactéries rendant ainsi les traitements d'élimination encore plus ardu. Pour remédier à cela, utiliser de l'inox qualité 316 L (acier renforcé de qualité supérieure, augmentant son caractère inoxydable et plus résistant à la corrosion) est recommandé. Les soudures faites lors de la construction du système doivent être nettes et sans aspérités. De plus, effectuer une passivation du circuit d'eau est préconisé, il s'agit d'un procédé de traitement de surface permettant de former chimiquement une couche protectrice à la surface de l'acier inoxydable, apportant donc une meilleure résistance face à la corrosion.

Par ailleurs, la détection en amont de la formation des biofilms est également importante. En effet, des suivis en continu de la charge bactérienne dans les circuits d'eau permettraient d'alerter le plus tôt possible sur un éventuel biofilm en formation. Des analyseurs de la charge microbienne en temps réel existent et permettent ainsi d'obtenir un résultat rapidement et d'instaurer des mesures de traitement adéquates.

D'autre part, ce manuscrit n'aborde pas les autres paramètres qui peuvent influencer la qualité de l'eau de façon directe ou indirecte tels que la mesure du pH, la présence d'ions chlorures, sulfates, aluminium, ammonium, calcium et magnésium. La corrélation entre divers marqueurs permettant de détecter les biofilms est en plein essor, avec notamment la recherche de marqueurs spécifiques de mise en évidence de biofilms autres qu'une contamination bactérienne. Des composants de la matrice tels que les polysaccharides peuvent être recherchés, comme les alginates qui sont impliqués dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. (105)

Parallèlement, la résistance des bactéries vis-à-vis de multiples agents d'élimination est une complication supplémentaire. En effet, la résistance des bactéries envers les désinfectants est semblable à celle vis-à-vis des antibiotiques rencontrés dans le milieu hospitalier. En somme, l'antibiorésistance est un enjeu de santé publique majeur puisqu'elle peut mener à des échecs thérapeutiques chez les patients. Cette antibiorésistance concerne également les bactéries engendrant des biofilms. En effet, *E.coli* est une bactérie impliquée dans les biofilms en milieu hospitalier et sa capacité à se multiplier rapidement conduit à une acquisition rapide de gènes de résistances vis-à-vis des antibiotiques.(106)

Finalement, la production et l'utilisation d'une eau répondant aux différentes réglementations et exigences est un enjeu majeur pour les industries pharmaceutiques et cela malgré les divers paramètres qui influencent directement ou indirectement la qualité de l'eau. Les biofilms représentent des obstacles à la production et à l'utilisation conforme de cette eau. Ils doivent être considérés à juste titre puisqu'ils peuvent mettre en péril la production de médicaments.

De ce fait, d'après les informations recueillies, par le biais de sources bibliographiques et des informations terrain, ce manuscrit fait ressortir un manque évident de maîtrise des biofilms dans les circuits d'eau pour les professionnels du secteur. Pourtant, la crainte de contaminations microbiologiques est un sujet d'importance capitale dans les industries pharmaceutiques. Le manque d'informations sur le sujet, la méconnaissance de la structure des biofilms, de leur développement et des impacts sur les diverses activités sont les principales lacunes identifiées.

Mon travail met donc en avant un sujet très peu abordé dans les industries pharmaceutiques, en soulignant la nécessité de gérer ces biofilms tant dans les processus de détection que dans les processus d'élimination. En définitive, une considération plus importante devrait être apportée vis-à-vis de la colonisation des biofilms dans les circuits d'eau. Ainsi, un entretien régulier et planifié des réseaux d'eau, un suivi et une détection précoce des germes circulant dans les réseaux d'eau permettraient d'anticiper et de limiter la formation de biofilms, source de tant de difficultés. L'essor des nouvelles technologies pourrait faire émerger de nouveaux appareils capables de détecter de façon plus sensible et plus spécifique les contaminations bactériennes et donc d'avoir une longueur d'avance sur la formation des biofilms.

## VII. Bibliographie

1. European Commission, The Rules Governing Medicinal Products in the European Union Volume 4 EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products.2022
2. A3P Association, Revue trimestrielle La Vague, L'eau N°56.2018
3. Lebeaux D, Ghigo JM. Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? médecine/sciences. Août 2012;28(8-9):727-39.
4. Eau potable, Organisation mondiale de la Santé [Internet]. [cité 6 janv 2023]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
5. Eau, hygiène et assainissement - UNICEF [Internet]. [cité 23 févr 2023]. Disponible sur : <https://www.unicef.fr/convention-droits-enfants/eau/>
6. Organisation mondiale de la Santé. Directives de qualité pour l'eau de boisson : 4e éd. intégrant le premier additif [Internet]. 4e éd + 1er additif. Genève: Organisation mondiale de la Santé; 2017 [cité 4 nov 2022]. Disponible sur : <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258887>
7. Journal officiel de l'Union européenne, DIRECTIVE (UE) 2020/2184 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 2020 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (refonte).2020
8. Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 18 déc 2022]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000465574/#:~:text=1321%2D4>
9. Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé [Internet]. [cité 18 déc 2022]. Suppression de la monographie Eau hautement purifiée (1927) de la Pharmacopée Européenne - Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé - EDQM. Disponible sur: <https://www.edqm.eu/en/-/suppression-de-la-monographie-eau-hautement-purifi%C3%A9e-1927-de-la-pharmacop%C3%A9e-europ%C3%A9enne>
10. Mailhot A, Duchesne S. Impacts et enjeux liés aux changements climatiques en matière de gestion des eaux en milieu urbain. Vertigo - Rev Électronique En Sci Environ [Internet]. 1 sept 2005 [cité 23 févr 2023] ;(Hors-série 2). Disponible sur : <https://journals.openedition.org/vertigo/1931>
11. L'alimentation en eau potable | Eaufrance [Internet]. [cité 23 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.eaufrance.fr/l'alimentation-en-eau-potable>

12. La production d'eau potable | Centre d'information sur l'eau [Internet]. 2017 [cité 23 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.cieau.com/espace-enseignants-et-jeunes/les-enfants-et-si-on-en-apprenait-plus-sur-leau-du-robinet/la-production-deau-potable/>
13. Eau en Seine-et-Marne [Internet]. 2022 [cité 23 févr 2023]. Étapes de production d'eau potable. Disponible sur : <https://eau.seine-et-marne.fr/fr/etapes-de-production-deau-potable>
14. Les étapes de la production d'une eau potable, Techmania.s.d. Disponible sur : [http://www.techmania.fr/CIEAU\\_playbac/production\\_deau\\_potable.pdfproduction\\_deau\\_potable.pdf](http://www.techmania.fr/CIEAU_playbac/production_deau_potable.pdfproduction_deau_potable.pdf).
15. 40 chiffres à savoir sur les réseaux d'eau en France en 2021 [Internet]. [cité 23 févr 2023]. Disponible sur : <https://www.monreseau'eau.fr/actualites/40-chiffres-reseaux-eau-potable-france-2021/>
16. Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). 2022
17. Organisation Mondiale de la Santé, Bonnes pratiques de fabrication de l'OMS : eau à usage pharmaceutique, Annexe 2, 2012
18. Pharmacopée Européenne 11.1 Monographie de l'eau purifiée (0008F), Strasbourg, France : Council of Europe. 2018
19. Pharmacopée Européenne 11.1 Monographie de l'eau pour préparations injectables (0169F) Strasbourg, France : Council of Europe.2023
20. Introduction à l'échange d'ions [Internet]. [cité 19 avr 2023]. Disponible sur : [http://dardel.info/IX/IX\\_Intro\\_FR.html](http://dardel.info/IX/IX_Intro_FR.html)
21. Liu Z, Haddad M, Sauvé S, Barbeau B. Alleviating the burden of ion exchange brine in water treatment: From operational strategies to brine management. *Water Res.* 15 oct 2021 ;205:117728.
22. Échange d'ions [Internet]. J. Huesa Water Technology - Tratamiento de aguas. [cité 19 avr 2023]. Disponible sur : <https://jhuesa.com/fr/technologies/echange-ions>
23. DLK Technologies SA - Processus de traitement de l'eau - Résines [Internet]. [cité 22 avr 2023]. Disponible sur : <https://www.dlk.ch/index.php/fr/resines>
24. Électrodéionisation (EDI) | Technologie de purification de l'eau | ELGA LabWater [Internet]. [cité 11 mars 2023]. Disponible sur: <https://fr.elgalabwater.com/technologies/electrodeionization-edi>
25. Electrodéionisation (EDI) - EUROWATER [Internet]. [cité 19 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.eurowater.com/fr-be/unite-de-traitement-de-leau/unites-edi-electrodesionisation>
26. Condorchem Envitech [Internet]. 2019 [cité 11 mars 2023]. Obtention d'eau ultra pure par électrodéionisation. Disponible sur : <https://condorchem.com/fr/blog/eau-ultra-pure-electrodeionisation/>
27. Electrodéionisation [Internet]. Elmatec. [cité 19 avr 2023]. Disponible sur: <https://elmatec.fr/produits/electrodeionisation/>
28. Systèmes exceptionnels de purification d'eau pour laboratoire, Thermo Scientific .2013

29. A3P - Industrie Pharmaceutique & Biotechnologie [Internet]. 2018 [cité 26 juin 2023]. La mesure en continu dans l'eau à usage pharmaceutique (EUP). Disponible sur : <https://www.a3p.org/la-mesure-en-continu-dans-leau-a-usage-pharmaceutique-eup/>
30. Analyseurs de carbone organique total (COT) et aperçu des paramètres | Hach [Internet]. [cité 10 avr 2023]. Disponible sur : <https://ch.hach.com/parameters/toc-fr>
31. Pharmacopée Européenne 11.1 Monographie de l'eau pour préparations injectables (0169F) Strasbourg, France : Council of Europe.2023
32. Pharmacopée Européenne 11.1 Monographie de l'eau purifiée (0008F).2018
33. Déon S, Fievet P. Chapitre XIII. Traitement des eaux par nanofiltration : généralités, mécanismes et applications. In : Crini G, Morin-Crini N, éditeurs. Eaux industrielles contaminées : Réglementation, paramètres chimiques et biologiques & procédés d'épuration innovants [Internet]. Besançon : Presses universitaires de Franche-Comté ; 2020 [cité 11 mars 2023]. p. 373-415. (Pratiques & techniques). Disponible sur : <http://books.openedition.org/pufc/11162>
34. Yang, Zhou, Feng, Rui, Zhang, Zhang. A Review on Reverse Osmosis and Nanofiltration Membranes for Water Purification. *Polymers*. 29 juill 2019 ;11(8):1252.
35. Micro-filtration et ultra-filtration [Internet]. [cité 10 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.lenntech.fr/francais/microfiltration-et-ultrafiltration.htm>
36. Comment Fonctionne l'Osmose Inverse et ses avantages | Groupe Optima [Internet]. [cité 11 mars 2023]. Disponible sur : <https://www.osmoseur-optima.fr/fonctionnement-osmose-inverse#:~:text=L'osmose%20inverse%20est%20un,travers%20une%20membrane%20semi%20perm%C3%A9able>
37. Osmose inverse : définition et explications [Internet]. [cité 27 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.aquaportail.com/definition-14730-osmose-inverse.html>
38. Oh HS, Constancias F, Ramasamy C, Tang PYP, Yee MO, Fane AG, et al. Biofouling control in reverse osmosis by nitric oxide treatment and its impact on the bacterial community. *J Membr Sci*. mars 2018;550:313-21.
39. Pharmacopée Européenne 11.1 Monographie de l'eau pour préparations injectables (0169F). Strasbourg, France : Council of Europe.2023
40. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res*. avr 2014;78(2):110-6.
41. Roux A, Ghigo JM. Les biofilms bactériens. *Bull Académie Vét Fr*. 2006 ;159(3):261-8.
42. Filloux A, Vallet I. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*. 1 janv 2003;19(1):77-83.
43. A3P Association, Revue trimestrielle La Vague, Microbiologie N°66.2020

44. Schlafer S, Meyer RL. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *J Microbiol Methods*. juill 2017; 138:50-9.
45. Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nat Rev Microbiol*. févr 2023;21(2):70-86.
46. Vandana, Das S. Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria. *Carbohydr Polym*. 1 sept 2022;291:119536.
47. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique.
48. Afreenish Hassan, Javaid Usman, Fatima Kaleem, Maria Omair, Ali Khalid, Muhammad Iqbal, Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates, 2011
49. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. *Clin Microbiol Rev*. janv 2012;25(1):193-213.
50. Mion S, Rémy B, Plener L, Chabrière É, Daudé D. *Quorum sensing et quorum quenching* : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? médecine/sciences. janv 2019;35(1):31-8.
51. Adley CC, Ryan MP, Pembroke JT, Saieb FM. *Ralstonia pickettii*: biofilm formation in high purity water. 2005.
52. Tavares M, Kozak M, Balola A, Sá-Correia I. *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. *Clin Microbiol Rev*. 17 juin 2020;33(3): e00139-19.
53. Kelly JJ, Minalt N, Culotti A, Pryor M, Packman A. Temporal Variations in the Abundance and Composition of Biofilm Communities Colonizing Drinking Water Distribution Pipes. Moustafa A, éditeur. *PLoS ONE*. 23 mai 2014;9(5): e98542.
54. Schneier M, Razdan S, Miller AM, Briceno ME, Barua S. Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. *Biotechnol Bioeng*. août 2020;117(8):2588-609.
55. Pharmacopée Européenne 11.0 chapitre 5.1.1 Méthodes de préparation des produits stériles. Strasbourg, France : Council of Europe 2017
56. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. Slauch JM, éditeur. *EcoSal Plus*. 8 févr 2018;8(1): ecosalplus.ESP-0001-2018.
57. Jiménez-Jiménez C, Moreno VM, Vallet-Regí M. Bacteria-Assisted Transport of Nanomaterials to Improve Drug Delivery in Cancer Therapy. *Nanomaterials*. 17 janv 2022;12(2):288.
58. Marcano R, Rojo MÁ, Cordoba-Diaz D, Garrosa M. Pathological and Therapeutic Approach to Endotoxin-Secreting Bacteria Involved in Periodontal Disease. *Toxins*. 29 juill 2021;13(8):533.

59. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Biochem.* 7 juin 2007 ;76(1):295-329.
60. Sakari M, Laisi A, Pulliainen AT. Exotoxin-Targeted Drug Modalities as Antibiotic Alternatives. *ACS Infect Dis.* 11 mars 2022 ;8(3):433-56.
61. Bacterial Enteritis in Animals | Amlan International [Internet]. <https://amlan.com/>. [cité 6 sept 2023]. Disponible sur : <https://amlan.com/challenge/bacterial-enteritis/>
62. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 4 mai 2017 ;43(3):313-51.
63. Pharmacopée Européenne 11.0 chapitre 2.7.24 Cytométrie en flux (20724F) Strasbourg, France : Council of Europe.2008
64. Pharmacopée Européenne 11.0 chapitre 5.1.6 Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique (50106F) Strasbourg, France : Council of Europe.2017
65. Grégori G, Denis M, Lefèvre D, Romano JC. Viabilité des bactéries hétérotrophes dans la baie de Marseille. *C R Biol.* août 2003 ;326(8):739-50.
66. Helmi K. Application de la cytométrie en flux pour le contrôle microbiologique de l'efficacité de traitements de l'eau.
67. Nolan JP, Condello D. Spectral Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom* [Internet]. janv 2013 [cité 5 juill 2023];63(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142956.cy0127s63>
68. Lee HJ, Ho MR, Bhuwan M, Hsu CY, Huang MS, Peng HL, et al. Enhancing ATP-based bacteria and biofilm detection by enzymatic pyrophosphate regeneration. *Anal Biochem.* avr 2010;399(2):168-73.
69. Hammes F, Goldschmidt F, Vital M, Wang Y, Egli T. Measurement and interpretation of microbial adenosine triphosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Res.* juill 2010;44(13):3915-23.
70. Nouvelle L. L'ATP-métrie pour maîtriser la qualité d'une eau ultra pure. 18 juill 2014 [cité 23 juin 2023]; Disponible sur : <https://www.usinenouvelle.com/article/l-atp-metrie-pour-maitriser-la-qualite-d-une-eau-ultra-pure.N1495567>
71. Archives des ATP-métrie [Internet]. GL Biocontrol. [cité 23 juin 2023]. Disponible sur : <https://www.gl-biocontrol.com/category/atp-metrie/>
72. Vang ÓK, Corfitzen CB, Smith C, Albrechtsen HJ. Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water. *Water Res.* nov 2014; 64:309-20.
73. Ultrasons biomédicaux, Inserm, La science pour la santé. [cité 21 juill 2023].Disponible sur : <https://www.inserm.fr/dossier/ultrasons-biomedicaux/>
74. Candoli P, Ceron L, Trisolini R, Romagnoli M, Michieletto L, Scarlata S, et al. Competence in endosonographic techniques. *Panminerva Med* [Internet]. juill 2019 [cité 21 juill 2023];61(3). Disponible sur : <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R41Y2019N03A0249>



75. Aldrich JE. Basic physics of ultrasound imaging. Crit Care Med. mai 2007;35(5):S131.
76. Maurício R, Dias CJ, Jubilado N, Santana F. Biofilm thickness measurement using an ultrasound method in a liquid phase. Environ Monit Assess. oct 2013;185(10):8125-33.
77. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Rox Anderson R, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to Confocal Microscopy. J Invest Dermatol. déc 2012;132(12):1-5.
78. ZEISS LSM 900 - Confocal for Materials Research [Internet]. [cité 8 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.zeiss.com/microscopy/en/products/light-microscopes/confocal-microscopes/lsm-900-for-materials.html>
79. Barbosa A, Miranda S, Azevedo NF, Cerqueira L, Azevedo AS. Imaging biofilms using fluorescence in situ hybridization: seeing is believing. Front Cell Infect Microbiol. 22 mai 2023 ;13:1195803.
80. Ozone désinfection sans produit chimique pour le developpement durable [Internet]. [cité 11 févr 2023]. Disponible sur : <https://www.ozone-service.fr/ozone-desinfectant-ecologique-sans-sous-produit.html>
81. Propriétés et structure de l’ozone [Internet]. [cité 6 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.lenntech.fr/bibliotheque/ozone/proprietes/ozone/ozone-proprietes.htm>
82. Désinfection et purification à l’ozone, aux UV et purification de l’eau | Veolia [Internet]. [cité 11 févr 2023]. Disponible sur : <https://www.watertechnologies.fr/applications/ozone-and-uv-water-disinfection-purification>
83. Décomposition de l’ozone [Internet]. [cité 6 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.lenntech.fr/bibliotheque/ozone/decomposition/ozone/ozone-decomposition.htm>
84. Rôle de l’ozone dans l’industrie alimentaire [Internet]. [cité 6 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.evoqua.com/fr/articles/ozone-makes-an-impact-in-the-food-industry/>
85. Farjami A, Jalilzadeh S, Siah-Shadbad M, Lotfipour F. The anti-biofilm activity of hydrogen peroxide against *Escherichia coli* strain FL-Tbz isolated from a pharmaceutical water system. J Water Health. 1 oct 2022;20(10):1497-505.
86. Kauppinen A, Ikonen J, Pursiainen A, Pitkänen T, Miettinen IT. Decontamination of a drinking water pipeline system contaminated with adenovirus and *Escherichia coli* utilizing peracetic acid and chlorine. J Water Health. 1 sept 2012;10(3):406-18.
87. Farjami A, Hatami MS, Siah-Shadbad MR, Lotfipour F. Peracetic acid activity on biofilm formed by *Escherichia coli* isolated from an industrial water system. Lett Appl Microbiol. 1 avr 2022 ;74(4):613-21.
88. Acide peracétique [Internet]. [cité 6 janv 2023]. Disponible sur : <https://www.lenntech.fr/procedes/desinfection/chimique/desinfection/desinfectants-acide-peracetique.htm>

89. Gulludec CL. La désinfection par le chlore des eaux destinées à la consommation humaine : intérêts et limites de cette pratique : bilan d'une enquête effectuée dans le département de l'Isère.
90. Li T, Wang Z, Wang C, Huang J, Zhou M. Chlorination in the pandemic times: The current state of the art for monitoring chlorine residual in water and chlorine exposure in air. *Sci Total Environ.* sept 2022; 838:156193.
91. Knox WE, Stumpf PK, Green DE, Auerbach VH. The Inhibition of Sulphydryl Enzymes as the Basis of the Bactericidal Action of Chlorine. *J Bacteriol.* avr 1948;55(4):451-8.
92. Canada S. Qu'est-ce que le rayonnement ultraviolet ? [Internet]. 2011 [cité 11 févr 2023]. Disponible sur : <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/securite-soleil/qu-est-que-rayonnement-ultraviolet.html>
93. Advances in application of ultraviolet irradiation for biofilm control in water and wastewater infrastructure. *J Hazard Mater.* 5 janv 2022 ;421 :126682.
94. Application d'un traitement OZONE / UV - Lenntech [Internet]. [cité 29 juin 2023]. Disponible sur : <https://www.lenntech.fr/systemes/uv/pharmaceutique/-data/application-ozone-uv.htm>
95. Liu X, Tang B, Gu Q, Yu X. Elimination of the formation of biofilm in industrial pipes using enzyme cleaning technique. *MethodsX.* 2014; 1:130-6.
96. Ripolles-Avila C, Ramos-Rubio M, Hascoët AS, Castillo M, Rodríguez-Jerez JJ. New approach for the removal of mature biofilms formed by wild strains of *Listeria monocytogenes* isolated from food contact surfaces in an Iberian pig processing plant. *Int J Food Microbiol.* juin 2020; 323:108595.
97. Liu X, Tang B, Gu Q, Yu X. Elimination of the formation of biofilm in industrial pipes using enzyme cleaning technique. *MethodsX.* 2014; 1:130-6.
98. Nahar S, Mizan MdFR, Ha AJ won, Ha SD. Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry: Enzyme-based biofilm prevention.... *Compr Rev Food Sci Food Saf.* nov 2018;17(6):1484-502.
99. Le bio-encrassement et le biofilm sont évités et éliminés [Internet]. MERUS France. [cité 8 janv 2023]. Disponible sur : [https://www.merus.fr/biofouling\\_biofilm/](https://www.merus.fr/biofouling_biofilm/)
100. Carrascosa C, Raheem D, Ramos F, Saraiva A, Raposo A. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *Int J Environ Res Public Health.* 19 févr 2021;18(4):2014.
101. Benech N, Chaffringeon L, Briot T, Kolenda C, Pirot F, Laurent F, et al. Les virus au service de la santé : les bactériophages. *médecine/sciences.* déc 2022;38(12):1043-51.
102. Les biofilms en milieu hospitalier : quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière ? - NOSO INFO [Internet]. 2019 [cité 10 oct 2023]. Disponible sur : <https://www.nosoinfo.be/nosoinfos/les-biofilms-en-milieu-hospitalier-quels-sont-les-enjeux-pour-lhygiene-hospitaliere/>

103. Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy MÉ, Tristan A, Vandenesch F. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : Les points-clés en 2010. médecine/sciences. nov 2010;26(11):943-9.
104. Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) Guide des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP). 2023105. Reichhardt C, Jacobs HM, Matwichuk M, Wong C, Wozniak DJ, Parsek MR. The Versatile *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Protein CdrA Promotes Aggregation through Different Extracellular Exopolysaccharide Interactions. O'Toole G, éditeur. J Bacteriol [Internet]. 8 sept 2020 [cité 26 oct 2023];202(19). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.00216-20>
106. Usui M, Yoshii Y, Thiriet-Rupert S, Ghigo JM, Beloin C. Intermittent antibiotic treatment of bacterial biofilms favors the rapid evolution of resistance. Commun Biol. 16 mars 2023;6(1):275.

## VIII. Annexes

### Annexe 1 : Résultats du questionnaire

1. Dans votre entreprise, comment la détection des biofilms est-elle planifiée (processus ponctuel, régulier, global et/ou précoce) ? Pourquoi ?

Nous n'avons pas de planification de détection de biofilms. Lorsque nous intervenons sur des éléments (changement de vanne, modification de tuyauteries), nous examinons les éléments retirés pour vérifier l'absence visuelle de biofilm. De plus, nous disposons d'une mesure de TOC en ligne et en cas de modification, nous faisons des contrôles microbiologiques et physico-chimiques pour monitorer ces points pendant 1 mois.

Pas de planification de la détection. Nous avons un monitoring microbiologique et dosage endotoxines pour vérifier la qualité EPPI des réseaux d'eau. En cas de résultat anormalement élevé et redondant, l'investigation pourra se pencher sur la question d'un biofilm éventuel.

Des prélèvements hebdomadaire d'eau purifiée sont effectués sur diverse point de soutirage pour réalisation d'analyse DGAT, germes spécifiques et Physico-chimique. Le niveau de contamination en DGAT nous indique l'alerte sur l'apparition d'un potentiel biofilm.

Monitoring hebdomadaire, routine. Fréquence de prélèvement + LAL (Gram -).

controle quotidien avec analyse de tendance

Ponctuelle et programmée

Aucune planification

Prélèvement toute les semaines

Processus régulier, car utilisation d'eau comme ingrédient

ponctuel en cas de suspicion

Réglementairement

Pas de process régulier spécifique à la détection de biofilms. Process de monitorings microbio réguliers en place sur utilités et équipements. La recherche de biofilms sera déclenchée en cas de détection d'un microorganisme susceptible de créer des biofilms.

2. Quelle(s) méthode(s) utilisez-vous actuellement pour détecter ces biofilms ?

TOC en ligne + analyse hebdomadaire en laboratoire selon PE

Monitoring microbiologique des points d'eau et dosage endotoxines. Pas d'autre méthode de détection.

Nous prélevons l'eau purifiée dans des pots stérile pour envoi au laboratoire d'analyse. Ces prélèvements sont effectués manuellement. Une procédure de prélèvement des eaux est disponible pour encadrer le processus de prélèvement.

Actuellement on n'a pas de méthode précise pour détecter les biofilms. On les suppose via les résultats microbiologiques.

analyse de tendance principalement avec identification des contaminants

Prélèvements d'eau

Aucune

Recherche GAVT sur R2A

Suivi de tendances microbiologie sur des volumes d'eau analysés plus importants (ex : analyse sur 1L) pour identifier les « signaux faibles »

prélèvement de surface+ microscopie

Prélèvements

En cas de suspicion de biofilm (sur la base du monitoring périodique): endoscopie du réseau/équipement (en ayant au préalable déterminé les points de rétention potentiels)

3. A quelle(s) difficulté(s) faites-vous face quant à la détection des biofilms ?

Notre système d'eau est ozonisé tous les jours et nous n'avons jamais eu de problématiques de biofilms.

Le cas ne s'est pas produit à ce jour. Pas d'observation de l'intérieur du réseau possible donc il est difficile de visualiser le biofilm ou réaliser des prélèvements supplémentaires (écouvillonnage)

Dans le cas où un seul point de soutirage est non conforme ou dépasse la limite d'alerte en DGAT alors la difficulté sera de :

- Localiser le biofilm.
- Identifier la cause de la contamination (réelle biofilm ou contamination du prélèvement par le préleveur).

Pas forcément reproductible et parfois difficile d'interprétation.

la non constance de la détection - le temps d'incubation de l'analyse

Besoin de plus de points de prélèvements et plus fréquents

Elle arrive souvent trop tard

Que le germe repousse après le repiquage

Les biofilms ne relarguent pas en continu, et peuvent être bien cachés ce qui fait que l'on peut passer à côté avec de l'écouvillonnage.

-

Réalisation prélèvement et la présence biofilm

les points de rétention potentiels doivent avoir été identifiés au préalable de l'endoscopie

4. Qu'envisageriez-vous pour dépasser ces difficultés ou optimiser cette détection (méthodes alternatives...)?

Non applicable

Pas de solution envisagées car le cas ne s'est pas produit

Prélèvement automatique. Mise en place de capteur à détection continu.

NA

methode cytometrie phase solide / un autre type de prelevement

Prendre un prestataire présent plus souvent

Mettre en place une méthode directe. Via des points de prélèvement par écouvillons par exemple

Rien

Aucune idée ! Mais en routine nous réalisons des nettoyages enzymatiques à fréquence régulière, avec analyse de la solution une fois le temps de contact effectué

méthode rapide?

NA

Le design du réseau (et des équipements) doit être optimisé pour limiter au maximum les points de rétention potentiels. Choix des matériaux doit aussi limiter le risque de croissance.

5. Dans votre entreprise, comment l'élimination des biofilms est-elle planifiée (processus ponctuel, régulier, global et/ou précoce) ? Pourquoi ?

Pas de processus d'élimination -> ozonisation quotidienne

Prévention de la formation des biofilms par : Un planning de maintenance est en place (désinfection des circuits, vérifications des paramètres,...) + action corrective en cas de redondance de non conformités

Annuellement et lors d'intervention sur la station nécessitant une désinfection de la cuve de stockage et de la boucle de distribution.

Désinfection de la boucle. Processus ponctuel si biofilm + en préventif (mensuel)

ponctuelle (entreprise peu reactive)

Régulier surveillance minimale

En action suite à non conformité

Désinfection du point non conforme

Plan de nettoyage enzymatique avec fréquentiel défini

nettoyage

En fonction des résultats

Préventivement :

pour la boucle d'eau, ozonification du circuit de distribution en routine, qui permet de prévenir la formation de biofilms.

Sanitisation hebdomadaire à la soude.

Passivation à une fréquence maximale de 10 ans (avant en cas de constat de dégradation du réseau)



6. Quelle(s) méthode(s) utilisez-vous actuellement pour éliminer ces biofilms ?

Non applicable

Pas de méthode d'élimination en place

Désinfection à l'aide d'un désinfectant : 1x/an lors de la maintenance annuelle de la station.  
Désinfection à l'UV : Les UV détruisent les bactéries et micro-organismes qui résident dans l'eau grâce à leur longueur d'onde. Cette lampe UV installée juste après la cuve de stockage et avant la distribution dans la boucle permet d'éliminer les micro-organismes c'est une méthode de désinfection qui n'utilise pas de produit chimique. \*

Microfiltration de l'eau du retour de la boucle à l'aide d'un filtre 0.2 micron (=filtre stérilisant)

Prévention de la création de biofilm :

- Conception limitant les bras mort

- L'eau de la boucle est en mouvement, la cuve est purgée toute les 20 minutes si aucune demande de soutirage n'a été demandé. L'eau ne stagne pas même lorsque que la station n'est pas utilisée.

Ozonisation

deconta chimique

Désinfection thermique ou avec chlore

Chimique

Désinfection au P3cosades

Nettoyage enzymatique (CIP et COP) suivi d'un nettoyage avec un produit alcalin puis un produit acide.

nettoyage pour éviter leur formation

Suivre les procédures

En cas de constat de présence de biofilms: sanitisation à la soude et H2O2/passivation, remplacement de conduits à risque

7. A quelle(s) difficulté(s) faites-vous face quant à l'élimination des biofilms ?

Pas de biofilms

Le cas ne s'est pas produit.

résistance du biofilm quant à la désinfection chimique

En fonction de l'avancée du biofilm, on peut avoir une résistance.

le retour a conformité immediat apres action mais reconta quasi immediate si action non suffisante avec une detection non immediate

Impossibilité d'utiliser le thermique et trop de bâtiments difficiles

Durée de traitement, résidus

Aucune

Machines non adaptées pour les nettoyages enzymatiques, refus des fabricants de machine d'utiliser cette technologie

-

Que cela recommence

Activités d'élimination nécessite des temps d'arrêt importants de l'installation, ainsi que des coûts importants.

8. Qu'envisageriez-vous pour dépasser ces difficultés ou optimiser cette élimination (méthodes alternatives...)?

Non applicable

Pas de solution envisagées à ce jour.

Optimisation de la désinfection :

- Méthode Stérilisation vapeur d'eau surchauffée à 121 °C cependant coût d'investissement très élevé.

NA

on cherche encore

Une cartographie complète

Empêcher l'apparition

Rien

Aucune idée (si ce n'est qu'on essaie d'alterner les produits chimiques utilisés pour nos nettoyages)

-

Uv

Recherche d'alternatives à la soude comme moyen de nettoyage (en limitant les risques de corrosion de l'équipement).

Nom : Joerg

Prénom : Solène

Née le 21 août 1998 à Strasbourg (67)

## DÉTECTION ET ÉLIMINATION DES BIOFILMS DANS LES INDUSTRIES PHARMACEUTIQUES : FOCUS SUR LES CIRCUITS D'EAU

Date et lieu de la soutenance : 28 novembre 2023 à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

N° ordre :

### RÉSUMÉ :

Au sein des industries pharmaceutiques et des établissements de santé, l'eau peut être utilisée en tant que matière première, excipient, ou encore dans les processus de nettoyage et de stérilisation. Dans les systèmes clos comme les circuits d'eau, toutes sortes de contaminations microbiologiques peuvent se produire et s'aggraver avec l'invasion de ces réseaux par des biofilms. À travers une étude bibliographique et une enquête de terrain, ce manuscrit montre l'importance de la planification dans la détection et l'élimination de ces biofilms. Mon travail met aussi en évidence le rôle central du pharmacien pour initier et conduire cette démarche.

### ABSTRACT :

Within pharmaceutical industries and healthcare facilities, water can be used as a raw material, an excipient, or in cleaning and sterilization processes. Inside closed systems like water circuits, all kinds of microbiological contamination may occur and get worse with biofilm invasion of that tubing network. Through a bibliographic study and a field survey, this manuscript shows the significance of planning the detection and the elimination of these biofilms. My work highlights the central role of the pharmacist to initiate and manage such process.

### MOTS – CLÉS :

Circuits d'eau, biofilms, bactéries, industrie pharmaceutique, contamination, détection, élimination

Nom du Directeur de Thèse : Dr. Patrice RASSAM