



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
l'environnement
« LAMAABE »

Mémoire du master Présenté par

Melle LAOUEDJ Fatima Zohra

Melle LOUKIL Djihane

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Intitulé du thème

Formation du biofilm sur les lentilles de contact

Soutenue le 29 juin 2022, devant le jury composé de

| | | | |
|---------------------|-------------------|-------------------------|---------------|
| Présidente | BENDIMERAD Nahida | Maître de conférences B | Univ. Tlemcen |
| Examinatrice | CHERIF ANTAR Asma | Maître de conférences A | Univ. Tlemcen |
| Encadreur | BELLIFA Samia | Maître de conférences A | Univ. Tlemcen |

Année Universitaire : 2021-2022.

Remerciements

*On commence par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciement à notre promotrice **Mme. BELLIFA SAMIA**, qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour tous les efforts qu'elle a consenti tout au long de l'élaboration de ce travail, elle était toujours présente et à notre écoute tout au long de la réalisation de ce travail. Ses encouragement et ses précieux.*

*Nous remercions **Mme. BENDIMERAD Nahida** d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire,*
*nous remercions **Mme. CHERIF ANTAR Asma** d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.*

En guise de reconnaissance, nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin au bon déroulement de ce travail.

Merci à tous.

Dédicaces

*Du profond de cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers,
A **ALLAH**, le très Haut, le très Grand, le Clément, L'Omniscient, l'Omnipotent. Le*

*tout Puissant, le très Miséricordieux qui m'a donné la capacité d'écrire et de
réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de*

*lever mes mains vers le ciel et de dire " **Ya Kayoum** " .*

*A mon adorable et très chère maman **Salima**, aucune dédicace ne saurait exprimer
mon amour, mon respect et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti
pour mon instruction et mon bien être, tu as guetté mes pas et m'a couvé de tendresse ,
de l'amour, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien
mes études.*

*A mon cher père **Ahmed**, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études.
A mes chères sœurs **Amina**, **Naziha** et **Linda** et mon cher frère **Mohamed El Amine**
qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long des mes
études. Que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.*

*A mes adorables neveux **Ayoub** et **Mohamed Ishaak**. Que dieu vous protège et vous
bénisse.*

*A ma grand-mère, mes oncles, mes tantes, mes cousines, mes cousins et mes proches
amis et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité, que dieu leur protège et
leur donne une longue et joyeuse vie.*

*Sans oublier mon binôme et mon très chère **Djihane** pour son soutien, sa patience et
sa compréhension tout au long de ce projet.*

*A toute ma promotion **Microbiologie LMD** et à tous **mes professeurs** que je porte un
grand respect pour eux, qui m'ont appris avec cœur tous ce que je sais.*

Fatima Zohra

Dédicaces

Il m'est très agréable de présenter à tous ceux qui par leur aide, assistance, conseils ont grandement contribué à l'élaboration de cette réalisation, et je tiens au plus fort de mon ame à fomuler toute ma gratitude et ma reconnaissance à Dieu qui m'a crée, guidé, orienté et armé de patience et comblé de succès et devant lequel je me prosterne devant sa grandeur.

*Je dédie cet humble travail avant tout a celle qui a tout le mérite et qui je dois le plus grand respect, celle qui m'a donné l'amour, la tendresse, la compréhension, le courage et la volonté, qui m'a permis d'arriver à surmonter tous les obstacles pour pouvoir donner le meilleur de moi-même : à toi ma très chère **MAMAN**.*

A mon père qui m'a encouragé vers la réussite.

*A mes grands parent **Mima** et **Ba** et mon chers ancle **Houcine**, vous resterez toujours vivants dans mon cœur et mes pensées, que Dieu vous accorde sa sainte miséricorde et vous accueille en son vaste paradis.*

*A mon frère **Ilyes**, mes sœurs **Nesrine** et **Tema** qui n'ont jamais cessé de croire en moi, que j'aime les plus dans la vie.*

A mon ancle, mes tantes, cousins et cousines.

*A mes adorables neveux **Yasser** et **Sanaa**. Que dieu vous protège et vous bénisse.*

*Dédicaces spéciales a ma sœur et mon binôme pour sa patience et sa compréhension, celle qui a partagé avec moi les moments les plus durs et les plus beaux de tous mon cursus universitaire sans lequel ce projet n'aurait pu se concrétiser, ma très chère amie et binôme : **Fatima Zohra**.*

A tous mes amis de la promos à qui je souhaite bonne chance dans leur vie professionnelle.

A toutes mes amies avec qui j'ai passé d'agréables moment durant ces cinq ans.

A tous les gens qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Djihane.

Résumé :

Le biofilm est une structure complexe formée par l'agglomération des microorganismes entre eux ou sur une surface de manière irréversible. Il peut se développer sur les dispositifs médicaux et provoque un large éventail des complications infectieuses. Vu les circonstances actuelles on a pu réaliser la partie pratique, c'est dans ce cadre que notre objectif s'oriente vers l'analyse de 2 articles. Le but de ces articles était de tester la capacité des souches bactériennes isolées à partir des lentilles de contact à former un biofilm par les 03 techniques (TM, RCA, PCR) et déterminer si les souches cliniques et de référence de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus* forment des biofilms sur les lentilles en silicone hydrogel. Sur les 265 souches, 53,5 % étaient modérément positifs, 33,2 % fortement positifs et 13,2 % négatifs pour la production du biofilm par TM et 36,6 % étaient modérément positifs, 40 % fortement positifs et 23,3 % négatifs pour la production du biofilm par RCA. Sur les 04 isolats de *S. aureus*, 02 ont montré la présence du gène *icaA*. Sur les 23 isolats CONS, 03 ont montré la présence du gène *icaA*. Tous les isolats de *Pseudomonas* étaient négatifs pour la présence du gène *pslA* bien que la plupart d'entre eux aient été phénotypiquement positifs pour la formation du biofilm. Les souches cliniques et de références de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. aureus* ont formé des biofilms sur les lentilles en silicone hydrogel Iotrafalcon A, sous forme de réseaux denses de cellules disposées en plusieurs couches avec une matrice extracellulaire visible. Donc les lentilles de contact est un terrain fertile pour les microorganismes et ainsi la formation du biofilm.

Mot clés : Biofilm, lentilles de contact, méthode en Tube, méthode de Rouge Congo Agar.

Abstract :

A biofilm is a complex structure formed by the agglomeration of microorganisms between them or on a surface in an irreversible form. It can develop on medical devices and causes a wide range of infectious complications. Given the current circumstances, we were unable to carry out the practical part, it is in this context that our objective is directed towards the analysis of 2 articles. The purpose of these articles is to test the ability of bacterial strains isolated from contact lenses to form a biofilm by 03 techniques (TM, CRA, PCR) and To determine if clinical and reference strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, and *Staphylococcus aureus* form biofilms on silicone hydrogel lenses Of the 265 strains, 53.5% were moderately positive, 33.2% strongly positive and 13.2% negative for biofilm production by TM and 36.6% were moderately positive, 40% strongly positive and 23.3% negatives for the production of the biofilm by CRA. Of the 04 isolates of *S. aureus*, 02 showed the presence of the *icaA* gene. Of the 23 CONS isolates, 03 showed the presence of the *icaA* gene. All *Pseudomonas* isolates were negative for presence of the *pslA* gene although most of them were phenotypically positive for biofilm formation. *P.aeruginosa*, *S. marcescens*, and *S. aureus* reference and clinical strains formed biofilms on lotrafilcon A silicone hydrogel lenses, as dense networks of cells arranged in multiple layers with visible extracellular matrix. So contact lenses are a breeding ground for microorganisms and thus the formation of biofilm

Key words : Biofilm, contact lenses , Tube method , Congo Red Agar method.

ملخص:

الشريط الحيوي هو عبارة عن بنية معقدة تتشكل عن طريق تكتل الكائنات الحية الدقيقة فيما بينها أو على السطح بشكل لا رجوع فيه. يمكن أن ينمو على الأجهزة الطبية و يسبب مجموعة واسعة من المضاعفات المعدية. نظرا للظروف الحالية لم تتمكن من تنفيذ الجزء العملي و في هذا السياق يتجه هدفنا نحو تحليل مقالتين. كان الهدف من هذه المقالات هو اختبار قدرة السلالات البكتيرية المعزولة من العدسات اللاصقة على تكوين غشاء حيوي 03 تقنيات (TM ، RCA ، PCR) وتحديد ما إذا كانت السلالات السريرية والمرجعية من *Pseudomonas aeruginosa* و *Serratia marcescens* و *Staphylococcus aureus* تشكل أغشية حيوية على عدسات سيليكون هيدروجيل. من بين 265 سلالات ، 53.5% كانت إيجابية بشكل معتدل ، 33.2% إيجابية بشدة و 13.2% سلبية لإنتاج الشريط الحيوي بواسطة TM و 36.6% كانت إيجابية بشكل معتدل ، 40% إيجابية بشدة و 23.3% سلبية لإنتاج الشريط الحيوي بواسطة RCA . من بين 04 عزلات من *S. aureus* ، أظهر 02 وجود المورثة *AacI* ، ومن بين 23 عزلات من SNOC ، أظهر 03 وجود المورثة *AacI* كانت جميع عزلات *sanomoduesP* سلبية لوجود المورثة *Alsp* على الرغم من أن معظمها كان إيجابية ظاهرياً لتشكيل الشريط الحيوي.

شكلت السلالات المرجعية و السريرية *P. aeruginosa* و *S. marcescens* و *S. aureus* الشريط الحيوي على العدسات من السيليكون الهيدروجيل كشبكات كثيفة من الخلايا مرتبة في طبقات متعددة مع نسيج خارج الخلية المرئي

لذا فإن العدسات اللاصقة هي أرض خصبة للكائنات الحية الدقيقة وبالتالي تكون البيوفيلم.
الكلمات المفتاحية: الشريط الحيوي، عدسات لاصقة، طريقة الأنوب، طريقة أحمر الكونغو اجار.

Table des matières

| | |
|------------------------------|------------|
| Liste des abréviations | <i>i</i> |
| Liste des figures | <i>ii</i> |
| Liste des tableaux | <i>iii</i> |
| Introduction | 1 |

Partie Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Lentilles de contact.....03

| | |
|---|----|
| 1. Historique..... | 03 |
| 2. Définition..... | 03 |
| 3. Les caractéristiques des lentilles de contact..... | 04 |
| 4. Classification des lentilles de contact..... | 04 |
| 4.1. Lentilles souples..... | 04 |
| 4.2. Lentilles rigides..... | 05 |
| 4.3. Lentilles hybrides..... | 05 |
| 4.4. Lentilles thérapeutiques..... | 06 |
| 5. Complications infectieuses causées par le port des lentilles (kératites infectieuses)..... | 06 |
| 5.1. Kératites bactériennes | 06 |
| 5.2. Kératites fongiques | 09 |
| 5.3. Kératites amibiennes..... | 10 |
| 5.4. Kératites virales..... | 11 |
| 6. L'entretien des lentilles de contacts..... | 11 |
| 6.1. Principales étapes..... | 12 |
| 7. Formation du biofilm sur les lentilles de contact..... | 13 |

Chapitre II: Généralités sur les biofilms.....15

| | |
|--|----|
| 1. Historique..... | 15 |
| 2. Définition..... | 15 |
| 3. Composition et organisation du biofilm..... | 15 |
| 4. Architecture du biofilm..... | 16 |
| 5. Rôle du biofilm..... | 16 |
| 6. Les étapes de formation du biofilm..... | 17 |

| | |
|--|----|
| 6.1. Film de conditionnement..... | 17 |
| 6.2. Transfert de la bactérie vers son support..... | 17 |
| 6.3. Adhésion réversible et irréversible..... | 17 |
| 6.4. Croissance du biofilm..... | 18 |
| 6.5. Maturation du biofilm..... | 18 |
| 6.6. Dispersion du biofilm..... | 18 |
| 7. Facteurs qui favorisent la formation du biofilm..... | 18 |
| 7.1. Les caractéristiques des cellules bactériennes..... | 19 |
| 7.2. Les caractéristiques du support..... | 19 |
| 7.3. Les caractéristiques du milieu..... | 19 |
| 8. Résistance de biofilm aux agents antimicrobiens..... | 20 |
| 9. Elimination du biofilm..... | 20 |

Partie Pratique

| | |
|--|-----------|
| Chapitre I : Matériel et Méthodes..... | 23 |
| 1. Lieu d'étude..... | 23 |
| 2. Prélèvements et ensemencements..... | 24 |
| 3. Etude de la formation du biofilm..... | 25 |
| 3.1. Les méthodes phénotypiques..... | 25 |
| 3.1.1. La méthode tube (TM)..... | 25 |
| 3.1.2. Les méthode de Rouge Congo Agar (RCA)..... | 26 |
| 3.2. La méthode génotypique..... | 26 |
| 3.2.1. PCR (Polymerase chain Reaction)..... | 26 |
| 4. Caractérisation du biofilm sur les lentilles de contact..... | 27 |
| 4.1. Formation et quantification du biofilm par la méthode de plaque de culture de tissu (TCP)..... | 27 |
| 4.2. Analyse par microscopie électronique à balayage des biofilms formés sur les lentilles de contact..... | 28 |
| 4.3. Analyse par microscopie confocal à balayage laser de l'architecture et de l'épaisseur du biofilm..... | 28 |

| | |
|---|-----------|
| Chapitre II : Résultats et discussion..... | 30 |
| 1. Prélèvements et ensemencements..... | 30 |
| 2. Etude de la formation du biofilm par la méthode en tube et la méthode RCA..... | 31 |
| 3. Confirmation par PCR de la formation du biofilm bactérien chez les porteurs de lentilles de contact..... | 34 |
| 4. Caractérisation du biofilm sur les lentilles de contact..... | 35 |
| 4.1. Évolution de la cinétique d'adhésion sur les lentilles Lotrafilcon A..... | 35 |
| 4.2. Analyse par microscopie électronique à balayage des biofilms formés sur les lentilles de contact..... | 37 |
| 4.3. Analyses par microscopie confocal à balayage laser de l'architecture et de l'épaisseur du biofilm..... | 38 |
| Conclusion..... | 41 |
| Références bibliographiques..... | 43 |
| Annexe | |

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection
C-di-GMP : Cyclique dimère guanosine monophosphate
CONS : *Staphylocoque* à coagulase négative
CSLM : Confocal Scanning Laser Microscope
DK : Perméabilité d'oxygène
EDTA : Éthylène diaminetétraacétique
FDA : Food and Drug Administration
HSV-1 : Herpes simplex virus de type 1
IQS : Inhibiteurs de détection de quorum sensing
ISO : Organisation internationale de normalisation
LPS : Lipopolysaccharide
MIP 133: Mannose-induced cytopathic protéin 133
NAC : N-acétylcystéine
NFGNB : Bacille gram négatif non fermentaire
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : Polymerase Chain Reaction
PMMA: Polyméthacrylate de méthyle
QS : Quorum sensing
RCA : Rouge Congo Agar
ROS : Espèces réactives d'oxygène
SDA : Gélose dextrose de Sabouraud
SEM : Scanning Electron Microscopy
TCP : Plaque de culture de tissus
TM : Méthode de tube
TSA : Gélose de soja tryptique
TSB : Bouillon de soja tryptique
UFC : Unités formant colonies
VZV : Virus varicelle-zona

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01: Kératite à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 7 |
| Figure 02 : Kératite à <i>Staphylococcus aureus</i> | 7 |
| Figure 03: Kératite à <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 8 |
| Figure 04: Kératite à <i>Aspergillus</i> | 10 |
| Figure 05: Kératite à <i>Acanthamoeba</i> | 11 |
| Figure 06 : Principales étapes de la formation des biofilms..... | 18 |
| Figure 07: Stratégies de lutte contre les biofilms. Les approches visant à empêcher la formation de biofilms sont encadrées en bleu..... | 22 |
| Figure 08: Fréquence des isolats bactériens obtenus à partir de la conjonctive, Lentilles de contact (souples - jetables mensuellement)..... | 30 |
| Figure 09: Détection du biofilm bactérien par la méthode en tube, montrant des résultats fortement positifs (a), modérément positifs (b) et négatifs (c)..... | 31 |
| Figure 10 : Détection du biofilm par la méthode Rouge Congo Agar, montrant des résultats fortement positifs (a), modérément positifs (b) et négatifs (c)..... | 32 |
| Figure 11 : Piste 1 - échelle d'ADN de 100 pb ; Piste 2-7 – Amplicon PCR Staph <i>icaA</i> | 34 |
| Figure 12 : Cinétique de croissance des biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> et <i>S. aureus</i> sur des lentilles de contact en silicone hydrogel. La croissance du biofilm a été surveillée en déterminant le nombre d'UFC à chaque instant étudié..... | 36 |
| Figure 13 : Morphologie brute et topographie de surface des biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> et <i>S. aureus</i> , par rapport aux cellules correspondantes à croissance planctonique. | 38 |
| Figure 14 : Analyse confocale de l'architecture des biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> et <i>S. aureus</i> . Les panneaux montrent une vue orthogonale des biofilms formés sur les lentilles de contact en silicone hydrogel par <i>P. aeruginosa</i> (A), <i>S. marcescens</i> (B) et <i>S. aureus</i> (C). Grossissement 340..... | 39 |

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des souches testées dans cette étude.....25

Tableau 2 : Détection de la production du biofilm de bactéries isolées obtenues à partir de porteurs de lentilles de contact.....33



Introduction

Les êtres humains recueillent la plus part des informations sur l'environnement extérieur à travers leurs yeux et ils s'appuient donc sur la vue plus que sur tout autre sens. L'œil humain est l'organe le plus sensible que nous ayons, c'est l'un des systèmes sensoriels les plus remarquables. Léonard de Vinci était parfaitement conscient de sa signification primordiale : « L'œil, qui est appelé la fenêtre de l'âme, est l'organe principal par lequel le sens commun peut avoir la vue la plus complète et la plus magnifique des œuvres infinies de la nature»

(Bjorn *et al.*, 2009).

Il y'a une estimation de 105 à 125 millions de personnes dans le monde (~ 1,6% de la population mondiale) portent les lentilles de contact comme alternative aux lunettes pour corriger les problèmes de la réfraction oculaire (**McGlinchey *et al.*, 2008**). Mais leur port est resté un facteur de risque pour le développement de divers évènement indésirables tels que la kératite microbienne (le port de lentilles de contact représentent environ 12% à 66% de tout les évènements de la kératite microbienne [**Dutta et Willcox, 2013**]; **Kackar *et al.*, 2017**]).

La lentille de contact est un corps étranger dans l'œil qui peut potentiellement favoriser les microorganismes pathogènes. La capacité des microorganismes à adhérer aux surfaces des lentilles de contact et à former du biofilm joue un rôle important dans le développement des infections oculaires liées au port de lentilles de contact [**Randler *et al.*, 2010**]; **(Udomwech *et al.*, 2022)**].

Lorsque les bactéries planctoniques rencontrent la surface des lentilles de contact, elles établissent d'abord les microcolonies qui constituent un stade précoce de la formation du biofilm. Le biofilm est une communauté microbienne qui peut adhérer à des surfaces biotiques ou abiotiques et produire des polysaccharides extracellulaires. Les cellules microbiennes qui se développent dans un biofilm sont physiologiquement distinctes des cellules planctoniques du même organisme, ils sont plus résistantes aux antibiotiques, aux désinfectants ou aux mécanismes de défense de l'hôte **(Dosler *et al.*, 2020)**.

Vu les circonstances actuelles, on a pas pu réaliser la partie pratique, c'est dans ce cadre notre objectif s'oriente vers l'analyse des articles portant sur la capacité de certaines souches bactériennes à former du biofilm sur les lentilles de contact, dans ce cadre deux articles ont été choisi :

- **Article 01** : Study of biofilm formation isolates from contact lens wearers **(Raksha *et al.*, 2020)**. Le but de cet article était de détecter la capacité de formation du biofilm

chez certaines souches bactériennes isolées à partir des lentilles de contact en utilisant des méthodes phénotypiques et génotypiques.

Article 02 : Increased Resistance of Contact Lens-Related Bacterial Biofilm to Antimicrobial Activity of Soft of Contact Lens Care Solutions (**Szczotka-Flynn *et al.*, 2009**). Le but de cet article était de déterminer si trois souches bactériennes cliniques et de référence de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus*, couramment associées à la kératite et à l'inflammation des lentilles de contact, peuvent former un biofilm sur les lentilles de contact en silicone hydrogel et évaluer la morphologie et l'architecture du biofilm en utilisant le microscope électronique à balayage et le microscope confocale.

Le manuscrit est divisé en trois parties. La première est une synthèse bibliographique qui présente en premier lieu les lentilles de contact, ensuite une revue bibliographique est faite sur les propriétés du biofilm. La deuxième partie détaille les matériels et méthodes qui a été réalisé par deux articles. Dans la dernière partie nous exposons les résultats obtenus par les auteurs en les discutant. Enfin une conclusion générale permet de résumer les résultats obtenus et de discuter les perspectives et applications potentielles d'un tel travail.

Partie Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1

Les lentilles de contact

1. Historique de lentilles de contact

Le concept des lentilles de contact était à l'origine d'une idée de Leonardo da Vinci en 1508 qui a pensé à neutraliser la cornée irrégulière par une nouvelle surface régulière pleine d'eau (**Sanchez Ferreiro et al., 2012**).

Les premières lentilles sclérales sont fabriquées en 1887 par Fredrich et Albert Muller en Allemagne pour gérer les maladies de la surface oculaire. Ces lentilles étaient des coques en verres soufflées sans puissance. Un an plus tard, en 1889 Aldof Fick décrit l'utilisation de lentilles sclérales avec optique pour corriger la vision (**Van der Worp et al., 2018**).

En 1948; la première lentille de contact cornéenne en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) par Tuohy, ce type de lentille avait un module d'élasticité élevé, dure, une mouillabilité de surface acceptable et durable mais elle ne permet pas la transmission d'oxygène vers la conjonctive et la cornée ce qui peut provoquer différents effets cliniques indésirables (**Talu et al., 2011**), suite à cette découverte; d'autres études de recherche sur le PMMA par la copolymérisation du méthacrylate de méthyle avec différents monomères ont donné naissance à des lentilles rigides perméables aux gaz (**Olufayoa et Abou-El-Hosseini, 2015**).

Les lentilles souples ou hydrogel ont été développées au milieu des années 1950 par le professeur Otto Wichterle et le Dr Drahaslav, elles ont eu un grand impact sur le marché de lentilles de contact en 1960. Ces lentilles sont fabriquées à partir de polymères hydrophiles gonflés en eau, réticules et flexibles, elles étaient complètement différentes aux lentilles rigides et donne une augmentation très importante du confort tout en permettant le passage de l'oxygène vers la cornée [(**Talu et al., 2011**); (**Sanchez Ferreiro et al., 2012**)].

À la fin des années 1999, les lentilles en silicone hydrogel sont apparues pour la première fois, elles ont été développées pour répondre aux besoins en oxygène de la cornée pour un port pendant la nuit ou prolongé de lentille (**Guillon, 2013**).

2. Définition

Une lentille de contact est un dispositif optique maintenu en contact prolongé avec le tissu vivant de l'œil. Elle représente une aide appréciable pour la vision en présence de troubles de la réfraction et un irremplaçable élément de traitement de certaines maladies chroniques de l'œil (**Roth, 2005**).

Elle a un grand avantage que les lunettes dans des nombreux aspects, tels que les cosmétiques, la compatibilité pour l'anisométrie (une différence de réfraction entre les deux yeux par exemple un œil hypermétrope et l'autre myope, ou de puissance dioptrique), une période

d'ajustement plus courte, la résolution des problèmes de poids en cas d'erreur de réfraction élevée et le traitement de choix pour l'astigmatisme irrégulier, elle est largement disponible, en particulier les lentilles souples (**Mordmuang et al., 2021**).

3. Caractéristiques

- **Mouillabilité:** c'est l'un des caractéristiques de surface d'une lentille de contact qui décrit la capacité d'un liquide qui est le film lacrymal à se répandre et se maintenir sur une surface solide qui est la surface de la lentille de contact (**Efron, 2010**).
- **Perméabilité à l'oxygène (DK):** la cornée reçoit la majeure partie de son oxygène de l'atmosphère. La perméabilité à l'oxygène est la propriété intrinsèque d'un matériau à transporter l'oxygène à travers sa masse, elle s'exprime par le DK où D: c'est la diffusivité du matériau et K: c'est la solubilité du matériau [(**Nicolson et Vogt, 2001**) ; (**Efron, 2010**)].

La privation d'oxygène peut entraîner des complications hypoxiques tels qu'un gonflement cornéen, une hyperémie limbique, une vascularisation cornéenne et un amincissement épithélial (**Galas et Copper, 2016**)

- **La rigidité :** Les lentilles de contact sont soumises à des forces de traction et de cisaillement lors de manipulation ou dans leur contact avec l'œil. Par conséquent la rigidité va conditionner sa durée de vie, sa facilité de manipulation, son confort ainsi que la stabilité de la vision (**Schalk, 2017**).
- **L'ionocité :** c'est la proportion en ions présente dans le matériau. Les matériaux ioniques présentent une meilleure mouillabilité, un meilleur confort mais favorisent les dépôts protéiques avec un risque d'encrassement de la lentille (**Savin, 2004**).

4. Classification

4.1. Lentilles souples

Les lentilles souples représentent plus de 90% de tout les nouveaux ajustement de lentilles de contact dans le monde (**Efron, 2010**).

Elles sont des matériaux très flexible, perméable à l'oxygène avec souvent une forte teneur en eau, cette flexibilité signifie que les lentilles souples s'adaptent à la forme de l'œil de l'utilisateur

beaucoup plus rapidement que les lentilles rigides, elles peuvent être disposées quotidiennement, hebdomadairement ou mensuellement. Elles sont 2-3 mm plus grandes que la cornée avec un diamètre de 14,5 mm [(**Moreddu et al., 2019**); (**Musgrave et Fang, 2019**)]. Les lentilles souples actuelles sont fabriquées avec deux types de matériaux : hydrogel et silicone-hydrogel. Ces dernières années, le développement continu des matériaux en silicone-hydrogel a inclus la modification de la surface de la lentille pour améliorer le confort du patient en augmentant la mouillabilité et la bicompatibilité du matériau avec le film lacrymal (**Mlyniuk et al., 2021**).

4.2. Lentilles rigides

Les premières lentilles rigides étaient en verre , de plus elles sont remplacées du polyméthacrylate de méthyle (PMMA),elles sont utilisées pour traiter l'astigmatisme et les irrégularités cornéennes. Le PMMA est un polymère durable et optiquement transparent avec un caractère hydrophile limité mais il a une perméabilité à l'oxygène négligeable, ce qui peut entraîner plusieurs problèmes de santé oculaire tels qu'hypoxie.

Le développement des matériaux rigides perméables aux gaz a commencé avec l'introduction des silicones-acrylates qui combinaient la perméabilité à l'oxygène du silicone avec la fabrication accessible du PMMA [(**Moreddu et al., 2019**); (**Musgrave et Fang, 2019**)].

Les lentilles rigides donnent une qualité de vision plus stable tout au long du temps de port car elles gardent leur forme, ne se déshydratent pas et corrigent les aberrations. Mais leur adaptation est plus technique et ne sont pas immédiatement confortable que les lentilles souples (**Colliot, 2019**).

4.3. Lentilles hybrides

Les lentilles hybrides comportent une zone optique centrale constituée d'un matériau rigide perméable à l'oxygène, entourée d'une zone d'ajustement périphérique constituée du silicone-hydrogel.

Elles ont un diamètre de 14,5 mm et combinent le confort du port des lentilles souples avec l'optique plus claire des lentilles rigides perméables à l'oxygène (**Moreddu et al., 2019**).

4.4. Lentilles thérapeutiques

Les lentilles thérapeutiques sont principalement utilisées pour soulager l'inconfort, aider à la vision dans les yeux avec des cornées irrégulières et pour guérir les tissus oculaires blessés.

Les lentilles souples sont utilisées pour faciliter la gestion de la chirurgie post-réfractive dans les yeux soumis à une ablation épithéliale et dans la dégénérescence cornéenne.

Les lentilles rigides sont utilisées comme dispositifs thérapeutiques pour corriger les anomalies cornéennes et les troubles oculaires liés aux déficiences du film lacrymal (**Moreddu et al., 2019**).

5. Complications infectieuses causées par le port des lentilles (kératites infectieuses)

La kératite infectieuse (kératite microbienne) est une inflammation du tissu cornéen due à une infection direct par des agents microbiens tels que les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus. C'est la complication la plus dangereuses qui survient en réponse au port de lentilles de contact qui peut être potentiellement dévastatrice pour la cornée (**Parasannakumary et Jyothy, 2017**).

5.1. Kératites bactériennes

La kératite bactérienne est une infection oculaire potentiellement menaçante pour la vue. Elle se caractérise par la présence des bactéries répliquatives sur la surface oculaire qui perturbent l'intégrité de l'épithélium cornéen et entraînent une inflammation du stroma cornéen. Les premières symptômes de cette infection comprennent des rougeurs oculaires, des douleurs, un larmoiement excessif, une sensibilité à la lumière et une vision floue (**Urwin et al., 2020**).

Le développement d'une kératite bactérienne nécessite d'abord l'adhésion des bactéries à la surface d'un épithélium cornéen altéré au niveau des récepteurs aux glycoprotéines par l'intermédiaire d'adhésines non filamenteuse ou de pilis (fimbriae) où ils se multiplient par la sécrétion des toxines et des enzymes protéolytiques. En absence de traitement les bactéries pénètrent et progressent dans le stroma cornéen et provoquent une ulcération (**Bourcier et al., 2007**).

Les agents pathogènes les plus fréquents associés à la kératite bactérienne sont: *Pseudomonas aeruginosa* (figure 1), *Staphylococcus aureus* (figure 2), *Streptococcus pneumoniae* (figure 3) et *Staphylococcus epidermidis* (**Egrilmez et Yildirim-Theveny, 2020**).

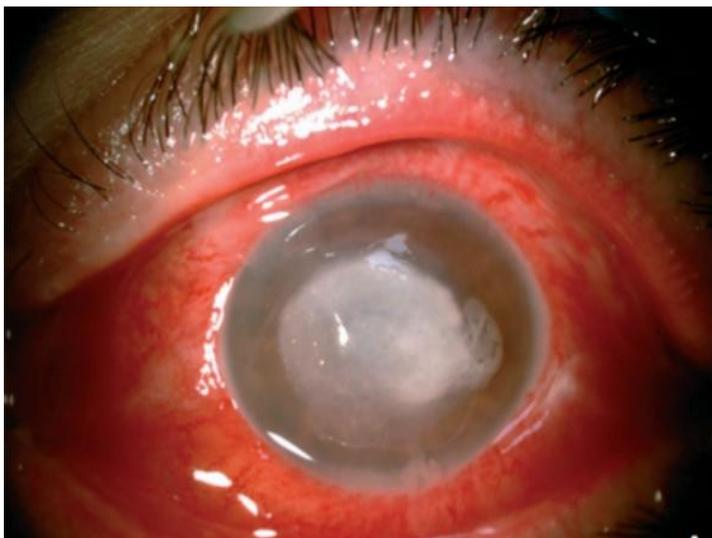


Figure 1: Kératite à *Pseudomonas aeruginosa* (Bourcier *et al.*, 2020).

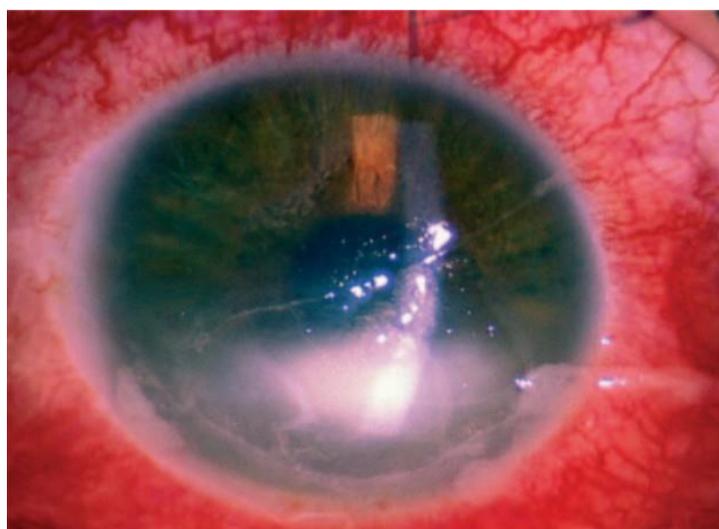


Figure 2 : Kératite à *Staphylococcus aureus* (Bourcier *et al.*, 2007).



Figure 3: Kératite à *Streptococcus pneumoniae* (Bourcier *et al.*, 2007).

- *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa de la famille des Pseudomonadaceae, c'est un bâtonnet (bacille) gram négatif encapsulé, aérobie, non sporulé, oxydase positive, ubiquitaire, c'est un agent infectieux nosocomial et communautaire, il produit des pigments tels que la pyocyanine(vert-bleu) et pyoverdine(jaune-vert), il peut persister dans certaines solutions antiseptiques utilisées pour désinfecter les lentilles de contact [(Salman *et al.*, 2019); (Ung et Chodosh, 2021)].

Cette bactérie produit deux enzymes qui sont la protéase et la gélatinase, ces dernières jouent un rôle important dans l'invasion de l'épithélium cornéen , elle peut adhérer et coloniser les matériaux des lentilles et survivre dans les étuis de stockage grâce à sa capacité de former un biofilm résistant. Donc il ne devrait pas être surprenant que *P.aeruginosa* ait rapidement trouvé une niche parmi les porteurs de lentilles de contact étant donné la gamme expansive de facteurs de virulence de la bactérie (lipopolysaccharide LPS, pili ou fimbriae, système de sécrétion de type III et alginate ...), ses faibles besoins nutritionnels et sa versatilité étonnante dans la formation du biofilm persistant sur des surfaces organiques et inorganiques [(Dyavaiah *et al.*, 2015); (Ung et Chodosh, 2021)].

- *Staphylococcus aureus*

S. aureus de la famille Staphylococcaceae, c'est une bactérie coccoïde gram positive, immobile, ubiquitaire, elle se distingue des autres staphylocoque par sa pigmentation dorée classique, sa β -hymolyse, une réaction de coagulase positive et la fermentation du mannitol.

Elle possède une gamme extensive de facteurs de virulence comprennent des toxines, des protéines et des enzymes (coagulase, protéase, hemolysins, elastin, collagen...) associées à la surface bactérienne qui favorisent l'adhérence aux tissus et aident à la formation du biofilm [(Astley *et al.*, 2019); (Ung et Chodosh, 2021)].

Cette bactérie peut également adhérer et coloniser les matériaux des lentilles de contact grâce à sa capacité de se développer sous forme d'un biofilm résistant sur les lentilles (Rossos *et al.*, 2020).

- *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae (pneumocoque) de la famille des Streptococcaceae, est peut-être le plus mal connu des principaux pathogènes bactériens de la cornée, c'est une bactérie anaérobie facultatif

à gram positive, visualisée sous forme de coque unique, de diplocoques en forme de lance ou de chaîne courtes. Elle peut provoquer une gravité des infections oculaires due aux ses nombreux facteurs de virulence notamment une capsule polysaccharidique, la pneumolysine, les neuraminidases et les métalloprotéinases au zinc [(Benton et Marquart, 2018); (Ung et Chodosh, 2021)].

- *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis est un coccus aérobie à gram positif, bien connu comme les principaux agents pathogènes responsables de la kératite infectieuse, cette bactérie produit un polysaccharide de surface impliqué dans l'adhérence et la formation du biofilm. Elle est capable également d'adhérer et de former un biofilm sur les lentilles de contact et même sur les parois internes des étuis de stockage de lentilles (Kalishwaralal *et al.*, 2010).

5.2. Kératites fongiques

La kératite fongique, également appelée kératite mycotique, kéraatomyose ou oculomyose, elle représente 5 à 20% de tout les cas de la kératite microbienne, c'est une infection cornéenne grave, menaçante la vue et très dommageable; elle entraîne souvent une cécité permanente et une perte des yeux, elle est plus répandue dans les régions tropicales et subtropicales.

La kératite fongique se présente généralement de façon subaiguë avec une douleur oculaire, suivie d'une vision floue, d'un rougeur, d'un larmoiement ou d'un écoulement excessif et d'une photophobie.

Les infections fongiques de la cornée sont causées par plus de 100 espèces différentes, bien que plus de 95% soient causées par les champignons filamenteux *Fusarium spp* et *Aspergillus spp* (figure 4) et par la levure *Candida spp* [(Dyavaiah *et al.*, 2015); (Brown *et al.*, 2021)]. Ces champignons sécrètent diverses mycotoxines, des antigènes fongiques et des enzymes protéolytiques (protéase à sérine, les métalloprotéases matricielles) qui permettent leur invasion et leur colonisation de la cornée. Ils peuvent pénétrer et se répliquer dans le stroma, attaquer la membrane de Descemet, diffuser en chambre antérieure et provoquer une endophtalmie. La formation d'un biofilm est un facteur important de pathogénicité, notamment lors des infections à champignon filamenteux comme le *Fusarium* [(Bourcier *et al.*, 2017); (Castano *et al.*, 2020)].



Figure 4: Kératite à *Aspergillus* (Bourcier *et al.*, 2017).

5.3. Kératites amibiennes

La kératite amibienne a été décrite pour la première fois par Jones en 1973. Elle représente environ 4% à 8% des cas de kératites microbiennes dans les pays où l'utilisation des lentilles de contact est plus fréquente, c'est une infection cornéenne rare mais la plus douloureuse, la plus sévère et avec le plus de séquelles visuelles, elle survient principalement chez un porteur de lentilles souples.

Elle est causée par l'amibe *Acanthamoeba* (figure 5), c'est un protozoaire saprophyte ubiquitaire qui se trouve dans le sol, l'air, l'eau douce ou salée et aussi dans l'eau du robinet ou les bouteilles d'eau de table capsulées et dans les étuis des lentilles de contact. Elle a deux stades dans son cycle de vie, une stade trophozoïte et une stade kystique. Le trophozoïte constitue la forme répliquative, mobile et responsable de l'invasion des tissus, le kyste représente la forme résistance dormante de l'organisme.

Les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* adhèrent à la surface cornéenne par la protéine liant le mannose (Mannose-Binding Protein), ils dégradent la barrière épithéliale par des mécanisme de cytolysse, de phagocytose et de l'apoptose. Ils envahissent le stroma par la sécrétion de plusieurs molécules de protéases (mannose-induced cytopathic protein ou MIP133, collagénase métalloprotéinase matricielle et activateur du plasminogène), puis traversent la membrane de Bowman et lysent le collagène.

Les principaux facteurs de risque de la kératite amibienne c'est le port de lentille de contact avec une mauvaise hygiène (l'utilisation de solution de rinçage salines et l'eau du robinet), le

baignade avec les lentilles, le port prolongé et le type de matériau [(Bouheraoua *et al.*, 2014); (Dyavaiah *et al.*, 2015); (Bloise *et al.*, 2019); (Fanselow *et al.*, 2021)].



Figure 5: Kératite à *Acanthamoeba* (Srinivasan *et al.*, 2008).

5.4. Kératites virales

La kératite virale c'est une infection qui a été observée également chez les porteurs de lentilles de contact à port quotidien, elle est causée par la contamination des lentilles de contact par différents virus comme le virus de l'hépatite B, le virus de l'herpès (Herpes Simplex Virus, HSV), le virus varicelle-zona (VZV), l'Adénovirus, le Cytomégalovirus...[(Dyavaiah *et al.*, 2015); (Schalk, 2017)].

Le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) est la principale cause de la kératite virale dans le monde, c'est un virus de la famille herpesviridae, il a un noyau électro-opaque contenant la capsidie encapsulant l'ADN double brin , le tégument qui contient des protéines pour la survie du virion dans les cellules hôtes et une enveloppe lipidique contient des glycoprotéines de surface qui permettent la fixation, la fusion et la perméabilité du virus aux cellules hôtes [(Cabrera-Aguas, 2019); (Zachary-Jordan, 2021)].

6. Entretien des lentilles de contact

Les lentilles de contact se sont des dispositifs médicaux qui nécessitent quotidiennement un nettoyage et une décontamination pour éliminer les dépôts qui favorisent un risque infectieux par la prolifération de germes et assurer un port confortable.

6.1. Principales étapes

Nettoyage : Il succède au retrait des lentilles. Il a pour le but d'éliminer les dépôts qui ont pour origines les larmes (dépôts lipidiques, aqueux ou de mucus) et le milieu extérieur (doigts, étuis, solutions d'entretien périmées, cosmétiques, maquillage, laque, pollution, fumée, aérosols...) grâce à une action mécanique par le massage et chimique. Les agents nettoyants les plus utilisés sont des composés amphotères non ioniques.

Le nettoyage s'effectue par un massage de la lentille sur les deux faces entre la paume de la main et la pulpe de l'index avec quelques gouttes de solution de nettoyage, pendant 15 à 20 secondes pour les lentilles souples, moins longtemps pour les lentilles rigides.

- ✚ **Rinçage:** c'est une étape qui s'effectue après le nettoyage, permet d'éliminer les dépôts décollés et réduire le nombre des germes qui se trouve à la surface de la lentille, il enlève 90% des contaminants et des débris.

Les solutions utilisées ne doit contenir aucun conservateur et être stérile, neutre et isotonique aux larmes [(Berthélémy, 2015); (Schalk, 2017)].

- ✚ **Décontamination:** elle a pour le but de réduire ou éliminer les germes présents sur la lentille jusqu'à obtenir un niveau acceptable, elle se réalise quotidiennement durant plus 6 heures. Les produits décontaminant sont de deux natures :

Les agents chimiques, qui ont évolué afin d'offrir une meilleure efficacité et tolérance, et sont soit polymériques (dérivés de la biguanine, ammoniums quaternaires), soit chimiques (chlorure de benzalkonium), ces derniers étant de moins en moins utilisés car susceptibles d'entraîner des réactions allergiques.

Les agents oxydants, dont le plus courant est le peroxyde d'hydrogène à 3 %, efficace si le temps de contact est suffisant mais toxique ; il nécessite une phase de neutralisation pour éviter une brûlure chimique, via une mousse de platine ou une enzyme, la catalase, qui transforme le peroxyde d'hydrogène en eau.

- ✚ **Le trempage et la conservation :** ils visent à prolonger la décontamination pour empêcher la prolifération des germes restés sur les lentilles et qui sont capable de contaminé le flacon de solution d'entretien après son ouverture ou encore l'étui de stockage des lentilles.

Les solutions sont souvent utilisées : Les biguanides, les ammoniums quaternaires et l'acide citrique.

- ✚ **Un dernier rinçage avant la pose :** il est conseillé afin d'éliminer toute trace des solutions employées. Les produits utilisés sont les mêmes que lors du premier rinçage.

- ✚ **Lubrification:** a pour le but d'améliorer le confort à la pose et pendant le port en utilisant des agents lubrifiants qui permettra d'améliorer la mouillabilité de la lentilles et la réduction de la sécheresse oculaire par leur pénétration dans la matrice de la lentille augmentant la rétention d'eau [(Berthélémy, 2015); (Schalk, 2017)].

7. Formation du biofilm sur les lentilles de contact

Les lentilles de contact sujettent à la formation du biofilm en fournissant une surface sur laquelle les microbes peuvent adhérer. Cette adhérence varie selon les conditions de stockage, la souche bactérienne, la température, le milieu utilisé, le moment, la fréquence de lavage des lentilles ...etc. Les bactéries peuvent entrer en contact avec l'œil par les doigts lors de l'insertion et du retrait de la lentille ou par les lentilles elles-même si les solutions de soins ou les étuis de conservation sont contaminés, Une fois les lentilles sont insérées dans l'œil, les protéines et d'autres composants des larmes s'adsorbent à sa surface, ce qui facilite l'adhésion des bactéries [(Fleiszig *et al.*, 2019); (Vivero-Lopez *et al.*, 2021)].

La présence d'une lentille sur l'œil peut également influencer négativement l'action antimicrobienne de la couche lacrymale, provoquant une augmentation de la charge bactérienne et une invasion ultérieure de la cornée par les microbes du biofilm transportés (Lagina, 2016). Le développement du biofilms microbiens à l'intérieur des étuis aux lentilles est une complication supplémentaire, car les biofilms développés sont résistants aux solutions de nettoyage de lentilles conventionnelles (Xiao *et al.*, 2018).

La formation d'un tel biofilm bactérien sur les lentilles entraîne une augmentation du nombre d'organismes et une exposition prolongée à la cornée ,en premier lieu le biofilm commence par une collection réversible des cellules flottant dans la solution près de la surface du boîtier, après il y aura une fixation des cellules sur le boîtier suivis par une constitution d'autres couches de cellules, ainsi la création d'un revêtement extérieur protecteur et enfin les microbes se détachent et se dispersent dans la solution à l'intérieur de l'étui ou sur la lentille de contact elle-même [(Lagina, 2016); (Bloise, 2017)].

Le biofilm bactérien rend le micro-organisme plus résistant aux effets antimicrobiens des systèmes d'entretien et permet à l'organisme de persister sur la surface de la lentille avec un risque d'atteinte des tissus soit directement, soit par l'intermédiaire de la production de toxines (Bloise, 2017).

Chapitre II

Généralités sur les

Biofilms

1. Définition

Les biofilms sont des communautés microbiennes enfermées dans une matrice autoproduite de substances polymères extracellulaires (EPS) qui se fixent à des surfaces biotiques ou abiotiques (les sols, les sédiments, les minéraux...). Les biofilms peuvent comprendre une ou plusieurs espèces environ 20 à 80 % des micro-organismes sur terre existent sous forme de biofilms (Yin *et al.*, 2020).

2. Historique

La découverte du biofilm a eu lieu en 17^{ème} siècle par Antonie Van Leeuwenhoek lorsqu'il a observé à l'aide de son invention du microscope la présence des microorganismes (animalcules) issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire (Roux et Ghigo, 2006).

En 1943, 1^{ère} étude scientifique était consacré aux biofilms (Parot, 2007). William Costerton a proposé, défendu et popularisé la notion biofilm (Squinazi, 2013). Par la suite Claude Zobell a montré que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension (Zobell, 1943). En 1983 Christensen et al ont démontré que les biofilms peuvent aussi se présenter sur les matériaux médicaux (les cathéters sont les premiers à observés chez *Staphylococcus epidermidis*).

3. Composition et organisation du biofilm

Les biofilms sont un groupe de micro-organismes dans lesquels les microbes produisent des EPS exemples les protéines, les polysaccharides, l'ADN et l'ARN. Il existe un autre composant dont l'eau (représente jusqu'à 97%) distribuée selon un schéma non homogène, ce dernier est responsable du mouvement des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm (Srinivasan *et al.*, 2021).

La composition et la structure d'EPS varient en fonction de plusieurs facteurs (type de micro-organismes, de la disponibilité des nutriments/substrats et de l'environnement de l'hôte), il intervient dans des rôles structurels et fonctionnels essentiels pour les propriétés émergentes des biofilms car il favorise l'adhésion microbienne aux surfaces biotiques et abiotiques et l'amélioration de la tolérance du biofilm aux antimicrobiens et aux cellules immunitaires, sa matrice fournit des microenvironnements chimiques, mécaniquement stables et complexes qui sont fondamentaux pour le mode de vie du biofilm (Karygianni *et al.*, 2020).

4. Architecture du biofilm

Le biofilm a une architecture unique défini par certains attributs structurels similaires aux canaux d'eau, l'épaisseur (variant d'une monocouche de cellules à des structures tridimensionnelles similaires à des colonnes) et la présence de vides. Cette architecture dépend des conditions nutritives, ils sont constitués d'une ou de plusieurs microorganismes. On parle du biofilm homogène ou hétérogène, la plupart d'entre eux sont hétérogène remodelés selon des critères endos ou exogène, ils peuvent être classés en biofilms monocouches, formés par une couche compacte à forte couverture de surface, ou biofilms multicouches, formés par des amas bactériens de morphologie différente avec une faible interaction de surface [(Konduri *et al.*, 2021); (Bezoui, 2016)].

5. Rôle du biofilm

Les biofilms peuvent être classés en trois principaux types qui sont les biofilms bénéfiques, nocifs, et neutres en fonction de leurs effets sur l'homme exemple l'environnement, la sécurité alimentaire, la production végétale et animale et les domaines médicaux.

Le premier type joue un rôle clé dans de nombreux processus, tels que le traitement des eaux usées, la biodégradation et la biorestauration. Lors du traitement des eaux usées, ils se forment dans le bioréacteur et participent à l'élimination des matières organiques, à l'adsorption des matières en suspension et à la purification des eaux usées brutes alors que dans les processus de biodégradation et de bio remédiation, les biofilms forment des communautés microbiennes uniques pour dégrader les herbicides, les antibiotiques.

Le deuxième type il intervient dans plusieurs types d'infections chez l'homme, y compris les infections associées aux dispositifs médicaux par différents micro-organismes dont les staphylocoques (*Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*) et *Pseudomonas aeruginosa*, les caries dentaires, la cystite, les infections pulmonaires associées à la mucoviscidose et l'endocardite, si les dispositifs médicaux contiennent des biofilms, ils entrent en contact avec les tissus humains, les bactéries survivent et prolifèrent, et entraînent une infection nocive.

Enfin le biofilm neutre existe dans la vie quotidienne humaine mais ne présente aucun dommage ou avantage en raison de l'absence d'effets nocifs ou bénéfiques, ils peuvent parfois être transformés en biofilms utiles dans des conditions uniques (Yin *et al.*, 2020).

6. Etape de formation du biofilm

La formation du biofilm est constituée de plusieurs étapes (figure 6) :

6.1. Film de conditionnement ou le film primaire

La première étape de formation se déroule en quelques minutes, c'est une étape rapide. Le film est formé par des dépôts de particules venues du milieu environnant en tant qu'une matière minérale (sel, glucides ; lipides...). Ce dernier sert à la modification des propriétés physicochimiques de surface pour la création d'un microenvironnement favorable à l'adhésion stable des bactéries ainsi qu'à la prévention de l'approche des bactéries [(Squinazi, 2013); (Bezoui, 2016)].

6.2. Transport des bactéries vers son support (surface)

Transport des microorganismes à proximité de surface à partir du milieu où le biofilm est en phase de dispersion, ce transport dépend de plusieurs facteurs dont la nature, les mouvements (sédimentation, mouvement brownien) et le milieu. Le chimiotactisme qui est un facteur biologique est défini comme un ensemble des mouvements des flagelles d'une cellule ou des récepteurs spécifiques sensibles aux variations de concentration des nutriments présents (Bezoui, 2016).

6.3. Adhésion réversible et irréversible

L'attachement bactérien réversible à une surface implique le dépôt d'une bactérie sur un substrat d'une manière que les bactéries restent dans un mouvement brownien bidimensionnel et peuvent être facilement détachées de la surface soit par la mobilité bactérienne, ou par les effets de cisaillement d'un fluide. Cette dernière est obtenue grâce aux effets de forces physiques non spécifiques dont les forces électrostatiques, les interactions hydrophobes et les interactions van der Waals dans le cadre de la théorie DLVO (Muhammad *et al.*, 2020).

Alors que l'adhésion irréversible correspond à une fixation active, spécifique des microorganismes sur une surface obtenue grâce aux effets d'interactions à courte portée exemple les liaisons d'hydrogène, cette adhésion progresse grâce à la production d'EPS secrétées par les bactéries et se poursuit pendant la maturation du biofilm [(Bezoui, 2016); (Muhammad *et al.*, 2020)].

6.4. Formation des microcolonies

Après l'étape d'adhésion les bactéries fixées se développent et se divisent soit par fission binaire soit par division asymétrique. Cela implique une prolifération cellulaire et une colonisation de la surface, ce qui conduit à l'activation des seconds messagers, à la communication intercellulaire et à la sécrétion initiale de la matrice EPS (**Guzmán-Soto *et al.*, 2021**).

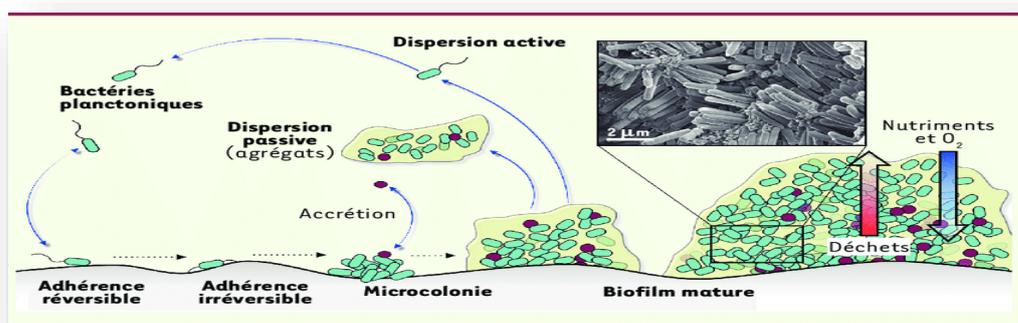
6.5. Maturation

La maturation du biofilm est divisée en deux phases dont la première concerne des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies tandis que la deuxième est marquée par des synthèses polymériques/protéiques importantes, dans ce cas le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (**Bezoui, 2016**).

6.6. Dispersion

La dernière étape de formation sous l'effet du vieillissement de biofilm. Il existe deux types de dispersion : la dispersion passive se fait par le biais de flux ou les forces de cisaillement en trois types qui sont l'érosion (est un détachement continu des cellules individuelles), relargage (est un détachement massif des bactéries) et l'abrasion (par collision des particules).

La dispersion active se fait grâce aux signaux environnementaux (azote, carbone...) elle est



effectuée par plusieurs facteurs comme la physiologie des cellules elle-même, modification des propriétés de surface (**Bezoui, 2016**)

Figure 6 : Principales étapes de la formation des biofilms (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

7. Facteurs qui favorisent la formation du biofilm

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

7.1. Caractéristiques de la cellule

La fixation des cellules bactériennes est également influencée par production d'EPS ainsi les flagelles, les pili, fimbriae et les adhérences non fimbriales qui aident les cellules bactériennes à établir un premier contact physique avec les substrats. Hydrophobicité est un autre facteur qui sert à réduire les forces répulsives entre la surface bactérienne et le substrat de colonisation, celle-ci dépend du milieu, du taux de croissance et des espèces bactériennes (**Muhammad et al., 2020**).

7.2. Caractéristiques du support ou surface

Les propriétés physicochimiques de la surface d'un substrat peuvent affecter l'attachement bactérien et la rapidité avec laquelle les biofilms se développent, y compris la rugosité de surface, l'hydrophobicité, la charge de surface et la présence de films de conditionnement.

Des études ont montré que plus une surface ou une bactérie est hydrophobe, plus l'attachement est fort ainsi les irrégularités des surfaces abiotiques qui favorisent l'attachement bactérien et le développement du biofilm en raison de forces de cisaillement plus faibles et d'une plus grande surface à laquelle les cellules bactériennes peuvent s'attacher sur des surfaces plus rugueuses. Ensuite la charge de surface est influencée par le milieu de croissance, l'âge bactérien, le pH et la force ionique et qui diffère entre les espèces bactériennes. Enfin la présence film de conditionnement, ce dernier se forme à la suite de l'adsorption de molécules nutritives sur les surfaces des matériaux, ce qui entraîne des modifications des caractéristiques physicochimiques des surfaces et affecte à son tour l'attachement bactérien (**Muhammad et al., 2020**).

7.3. Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs, tels que les changements dans les niveaux d'oxygène qui peuvent affecter la formation de biofilms dans diverses espèces de bactéries, la Température et les conditions de faible teneur en nutriments qui créent un stress sur les micro-organismes et déclenchent la formation de

biofilm. Cependant, les biofilms ne sont pas capables de mûrir si les niveaux de nutriments sont constamment bas...[(**Bezoui, 2016**); (**Samrot et al., 2021**)].

8. Résistance du biofilm aux agents antimicrobiens

La résistance des biofilms aux antimicrobiens peut se développer par divers mécanismes. L'expression des pompes d'efflux peut être induite dans différentes parties du biofilm et la fréquence des mutations est induite, tandis que la présence d'ADN extracellulaire et le contact étroit entre les cellules favorisent le transfert horizontal de gènes. Cette résistance est d'origine de plusieurs facteurs tels que la nature et la structure du biofilm, la disponibilité des nutriments et de l'oxygène pour les cellules bactériennes, la résistance bactérienne intrinsèque et acquise ainsi l'état métabolique des bactéries associées au biofilm [(**Roy et al., 2017**); (**Uruen et al., 2020**)].

9. Elimination du biofilm

Les biofilms ont un impact économique important. Il est nécessaire de développer des moyens de lutte efficaces contre la formation de biofilms. La lutte contre les biofilms peut se définir selon deux modes principaux : soit d'empêcher la formation de biofilms (stratégies préventives), et lorsqu'ils sont déjà présents les détruire (stratégies curatives)(figure 7) (**Bezoui, 2016**).

Afin d'éviter le développement de biofilms, il convient d'empêcher l'adhérence des cellules planctoniques à diverses surfaces ou le développement de microcolonies prématurées ainsi que de biofilms matures .L'attachement pourrait être abordé soit en modifiant la surface ou cibler des propriétés physicochimiques telles que l'hydrophobie de surface pour bloquer l'attachement microbien ou de les pré conditionner avec des produits chimiques pour empêcher la fixation initiale .Pour induire le détachement du biofilm, les polymères EPS doivent être perturbés ou les cellules doivent être programmées pour se disperser (**Shrestha et al., 2022**). Le second messager intracellulaire bis-(3'-5')-cyclique dimère GMP (c-di-GMP) est impliqué dans la régulation de chaque étape du développement du biofilm, un niveau élevé de c-di-GMP intracellulaire est associé à la formation de biofilm, tandis qu'un faible niveau intracellulaire de c-di-GMP tend à faciliter un mode de vie planctonique (**Liu et al., 2022**).

Pour le cas de l'inhibition de la formation du biofilm, il est préférable de tuer les bactéries dès les premières phases de développement en ciblant les composants , mécanismes cellulaires par

le biais des agents chélateurs tels que l'EDTA (acide éthylène diaminetétraacétique) qui peuvent endommager la paroi et perturbent le biofilm en séquestrant le zinc, magnésium, fer et calcium ou inhiber les adhésines ainsi EPS par des enzymes qui dégradent non seulement la matrice mais aussi les biofilms matures chez certaines espèces dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, ils sont aussi utilisées dans la stratégie de dispersion de biofilm en tant qu'agent antimicrobien, il s'agit d'alpha amylase, de la Dispersine B ou DspB et de la DNase I (Shrestha *et al.*, 2022). Exemple des dispositifs médicaux il est recommandé d'utiliser les revêtements d'argent qui libèrent les ions d'argent (Ag⁺) de la surface (Muhammad *et al.*, 2020).

Les tensioactifs sont le choix populaire des agents antimicrobiens pour inhiber l'adhésion bactérienne aux surfaces car ils diminuent la tension interfaciale entre deux substrats dont les biosurfactants ainsi les extincteurs de quorum (QQ) ou les inhibiteurs de détection de quorum (QSI) peuvent agir aussi comme inhibiteur ou disperseur de biofilm par des enzymes pour inactiver les signaux de détection de quorum lactonase, acylase et l'oxydoréductase de diverses espèces de bactéries... [(Muhammad *et al.*, 2020); (Uruen *et al.*, 2020);](Shrestha *et al.*, 2022). L'inhibition du QS peut se produire en inhibant la synthèse des auto-inducteurs, la dégradation des molécules de signalisation, l'interférence avec la liaison du signal et l'inhibition de la cascade de transduction du signal, ce qui entraîne une signalisation dérégulée du biofilm par la suite, la dispersion ou l'inhibition du biofilm (Hawas *et al.*, 2022). La polythérapie repose principalement sur l'utilisation de phages et ou de produits dérivés de phages avec des antibiotiques. Les actions synergiques des monophages, des cocktails de phages ou des enzymes dérivées de phages avec des antibiotiques, c'est une méthode qui sert à détruire le biofilm et qui nécessite une compréhension plus approfondie de la résistance des bactéries aux phages et des mécanismes de co-évolution entre les phages et les bactéries, afin de minimiser la probabilité d'émergence d'une résistance (Amankwah *et al.*, 2021). La NAC un agent mucolytique ayant le potentiel d'éradiquer les biofilms bactériens, qui sert à réduire la production de matrice EPS et favorise la perturbation des structures matures..... (Pinto *et al.*, 2020).

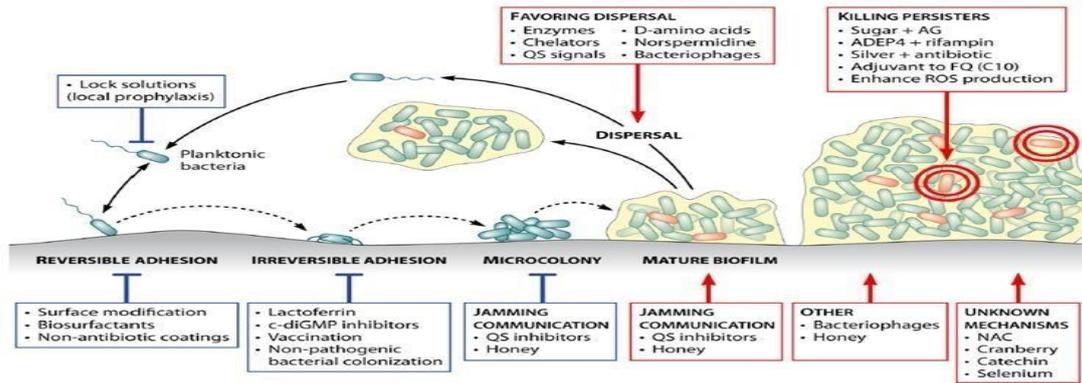


Figure 7: Stratégies de lutte contre les biofilms. Les approches visant à empêcher la formation de biofilms sont encadrées en bleu. Les approches visant à l'éradication des biofilms préexistants sont encadrées en rouge. Les cellules persistantes sont en orange. AG, aminoglycosides ; c-diGMP, cyclic di-GMP ; FQ, fluoroquinolones ; NAC, N-acétylcystéine ; QS, quorum sensing ; ROS, espèces réactives d'oxygène (**Lebeaux *et al.*, 2014**).



Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude

- **Article 01** : Study of biofilm formation isolates from contact lens wearers

Le premier travail de **Raksha et al., 2020** qui a réalisé une étude observationnelle au département de microbiologie et d'ophtalmologie au sein de l'hôpital de soins tertiaires attaché à une faculté de médecine.

Un total de 40 porteurs de lentilles de contact dans le groupe d'âge de 18 à 35 ans, composé d'étudiants en médecine de premier cycle et de troisième cycle, ont été inclus dans cette étude. Tous les 40 utilisateurs de lentilles de contact ont été porteurs de lentilles pendant une période de plus de 4 à 5 ans. Les sujets de l'étude étaient des utilisateurs de lentilles de contact souples en silicone hydrogel. La fréquence de changement de port de lentilles de contact est la suivante :

- Lentilles de contact à port mensuelles: 37 participants.
- Lentilles de contact à port journalier : 1 participant.
- Lentilles de contact à port trimestriel: 2 participants.

L'étui de stockage pour lentilles de contact a été utilisé pendant une durée de 4 à 6 mois par la population étudiée. Tous les participants ont été examinés par un ophtalmologiste à l'aide d'une lampe à fente. Les personnes souffrant d'infections oculaires, de maladies oculaires coexistantes, d'utilisation d'antibiotiques dans un mois et de maladies systémiques ont été exclues de l'étude (**Raksha et al., 2020**).

- **Article 02** : Increased Resistance of Contact Lens-Related Bacterial Biofilm to Antimicrobial Activity of Soft of Contact Lens Care Solutions

Concernant la deuxième étude, **Szczotka-Flynn et al., 2009** a utilisé des lentilles de contact souples Lotrafilcon A (CIBA Vision, Duluth, GA). Toutes les lentilles ont été fabriquées dans une courbe de base de 8,6 mm et +1,50 dioptries. Cette lentille est un polymère d'hydrogel de silicone non ionique du groupe 1 de la FDA des États-Unis avec 24 % d'eau et un revêtement de surface permanent au plasma de 25 nm. Il a été choisi pour représenter un matériau d'hydrogel de silicone à port prolongé de premier plan et est l'un des 2 types de lentilles souples approuvés par la FDA pour un port prolongé jusqu'à 30 jours (**Szczotka-Flynn et al., 2009**).

2. Prélèvements et ensemencements

- **Article 01**

Pour la première étude de **Raksha et al., 2020**, des échantillons ont été prélevés à partir de la conjonctive, les lentilles de contact et les étuis de stockage des lentilles des deux yeux des porteurs de lentilles de contact. Un total de six échantillons chacun a été prélevé à partir du 40 porteurs de lentilles de contact (N = 240). (c-à-d les trois prélèvements de la conjonctive, les lentilles de contact et les étuis pour les deux yeux ça fait six échantillons, ce dernier multiplie fois 40 porteurs pour obtenir 240 échantillons).

Les échantillons ont été obtenus par l'écouvillonnage des sacs conjonctivaux inférieurs, des étuis de stockage de lentilles en utilisant des écouvillons stériles et les lentilles de contact ont été prélevés (de manière aseptique) sur des personnes au moment où elles devaient être jetées. Tous les échantillons ont été incubés pendant 24 heures à 37 °C dans le bouillon cœur-cerveau, puis repiqués sur la gélose au sang, gélose MacConkey et gélose dextrose de Sabouraud (SDA). La gélose au sang et la gélose MacConkey ont été incubées à 37°C alors que la SDA a été incubée à 25°C.

Les microorganismes cultivés ont été identifiés en utilisant les techniques microbiologiques standard. Sur les 240 échantillons obtenus, 6 échantillons avaient une croissance stérile et 27 d'entre eux présentaient une croissance polymicrobienne ; par conséquent, le nombre total d'isolats bactériens obtenus était de 265 (**Raksha et al., 2020**).

- **Article 02**

Concernant la deuxième étude de **Szczotka-Flynn et al., 2009**, Les espèces bactériennes suivantes ont été utilisées dans la présente étude : *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus* (tableau 1). Ces espèces ont été sélectionnées parce qu'elles sont des agents causaux courants d'infections et d'inflammations associées aux lentilles de contact. Les souches de l'American Type Culture Collection (ATCC) utilisées étaient basées sur les recommandations du document d'orientation de la Food and Drug Administration (FDA). Les bactéries ont été cultivées pendant une nuit à 37 ° C dans un bouillon de soja tryptique (MP Biomedicals, Solon, OH), lavées 3 fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et la suspension cellulaire a été ajustée par spectrophotométrie (longueur d'onde 660 nm) (**Szczotka-Flynn et al., 2009**).

Tableau 1 : Liste des souches testées dans cette étude (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009).

| Espèces | Isoler | La source |
|----------------------|------------|---|
| <i>P. aeruginosa</i> | ATCC 9027 | ATCC (de l'infection de l'oreille externe) * |
| | MRL8620 | CMM * |
| <i>S. marcescens</i> | ATCC 13880 | ATCC (à partir de l'eau du bassin) |
| | MRL9195 | MMT |
| | 056SM | Lentilles de contact d'un patient présentant des yeux rouges aigus de lentilles de contact (CLARE) dans l'étude sur les lentilles de contact d'analyse longitudinale de l'hydrogel de silicone (LASH) |
| | 094SM | Lentilles de contact d'un patient atteint de kératite infiltrante l'étude de lentilles de contact d'analyse longitudinale de l'hydrogel de silicone (LASH) |
| <i>S. aureus</i> | ATCC 6538 | ATCC (d'une lésion humaine) |
| | ATCC 43300 | ATCC (isolat clinique) |
| | 094SA | Lentilles de contact d'un patient atteint de kératite infiltrante l'étude de lentilles de contact d'analyse longitudinale de l'hydrogel de silicone (LASH) |

ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, MD ; CMM – Centre de Mycologie Médicale (CMM), Centre Médical des Hôpitaux Universitaires

L'étude LASH (réalisée par LSF au Centre Médical des Hôpitaux Universitaires) est une étude de cohorte prospective en cours portant sur 208 utilisateurs de lentilles lotrafalcon A portées en continu jusqu'à 30 jours de port.

- **Article 01**

3. Etude de la formation du biofilm

3.1. Les méthodes phénotypiques

3.1.1. La méthode tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrit par **Christensen *et al.*, 1982.**

Les isolats bactériens (boucle de bactéries) obtenus ont été inoculés dans un bouillon trypticase soja additionné de 1% de glucose (TSBglu) et incubés pendant 24 heures à 37°C.

Les tubes ont été décantés et lavés avec du PBS (pH 7,3) et séchés. Les tubes séchés ont été colorés avec du cristal violet (0,1 %). L'excès de colorant a été éliminé et les tubes ont été lavés avec de l'eau déminéralisée. Les tubes ont ensuite été séchés dans une position inversée et observés pour la formation du biofilm. La souche productrice du biofilm confirmée en laboratoire était utilisée comme témoin positif (**Raksha et al., 2020**).

3.1.2. La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives (**Ziebuhr et al., 2001**).

La production de slime a été recherchée sur le milieu Rouge Congo Agar(RCA). Selon **Freeman et al., (1989)**, le milieu a été préparé avec 37 g/L BHIB, 50 g/L de saccharose, 10 g/L d'agar et 0,8 g/L du Rouge Congo Agar, puis autoclavé à 121°C pendant 15 minutes (**Nasr et al., 2012**). Le milieu estensemencé avec une anse d'une suspension de notre souche. La lecture à été faite après 24 heures à 37°C (**Jain et Agarwal, 2009**).

3.2. Méthode géotypique

3.2.1. PCR (Polymérase Chain Reaction)

La méthode PCR a été utilisée afin de détecter les gènes liés à la formation de biofilms chez les espèces de *Staphylococcus* et *P. aeruginosa*.

Les cultures bactériennes ont été lysées, l'ADN extrait et les amorces spécifiques aux gènes ont été utilisées pour amplifier les fragments d'ADN à l'aide de la PCR.

La matrice d'ADN a été obtenue par la méthode brute : Des boucles pleines de culture ont été prélevées à l'aide d'une pipette stérile, mises en suspension dans 50 µl d'eau exempte de nucléase, bouillies à 95°C pendant 10 minutes et centrifugées à une vitesse de 14 000 rpm pendant 1 minute. Le surnageant (2 µl) obtenu a été utilisé comme matrice.

Les séquences d'amorces pour le gène *icaA* de *Staphylococcus spp.* et *pslA* de *P. aeruginosa* sont les suivants.

IcaA F : 5'-TCTCTTGCAGGAGCAATCAA-3' 188 pb

A : 5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3'

PslA F : 5'-CACTGGACGTCTACTCCGACGATAT-3' 1119 pb

A : 5'-GTTTTCTTGATCTTGTGCAGGGTGTC-3'

- **Mélange réactionnel (20 µl)**

2,0 µl de suspension de matrice, 1,0 µl de FP 10 µM (amorce directe), 1,0 µl de RP 10 µM (amorce inverse), 6,0 µl d'eau exempte de nucléase, 10 µl de Master mix composé de: Taq ADN polymérase, dNTP, Chlorure de magnésium et tampons de réaction à des concentrations optimales.

- **Condition de réaction PCR pour le gène 1 (*icaA*)**

Un programme d'étapes thermiques a été utilisé, comprenant les paramètres suivants : incubation à 95 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles à 95 °C pendant 45 secondes (dénaturation), 55 °C pendant 30 secondes (hybridation), 72 °C pendant 20 secondes (élongation) et 72°C pendant 10 minutes après la fin des 30 cycles. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %.

- **Condition de réaction PCR pour le gène 2 (*pslA* de *P. aeruginosa*)**

Un programme d'étapes thermiques a été utilisé, comprenant les paramètres suivants : incubation à 95 °C pendant 5 minutes, suivie de 30 cycles à 95 °C pendant 45 secondes (dénaturation), 55 C pendant 30 secondes (hybridation), 72 °C pendant 1 minute 20 secondes (élongation) et 72°C pendant 10 minutes après la fin des 30 cycles. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (Raksha *et al.*, 2020).

- **Article 02**

4. Caractérisation du biofilm sur les lentilles de contact

4.1. Formation et quantification du biofilm par la méthode de Plaque de culture de tissus (TCP)

La technique de TCP permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm décrit par O'Toole *et al.*, 2000.

Les lentilles Lotrafilcon A ont été lavées avec du PBS, placées dans des plaques de culture tissus à 12 puits avec 4 ml de suspension cellulaire standardisée (l'absorbance était de 0,1 à 660 nm) et incubées pendant 120 minutes à 37 °C pour permettre l'adhésion des cellules à la surface de la lentille (phase d'adhérence). Ensuite, ces lentilles (qui contenaient toutes des bactéries adhérentes) ont été transférées dans de nouvelles plaques à 12 puits contenant du PBS frais (4

ml). Ensuite, les lentilles ont été immergées dans un bouillon de soja tryptique (TBS) à 1 % et incubées pendant différentes périodes (2, 6, 18 et 24 heures) à 37 °C sur une plate-forme basculante. Aux points de temps indiqués, les lentilles avec biofilm bactérien ont été lavées avec du PBS et transférées dans un tube conique de 1,5 ml avec 1,0 ml de PBS. Pour quantifier les biofilms, des lentilles sur lesquelles des biofilms ont été formés par différentes espèces et souches bactériennes ont été soniquées pendant 5 minutes et vortexées pendant 3 minutes. Les suspensions cellulaires résultantes ont été collectées, diluées en série dans du PBS et des aliquotes ont été étalées sur des plaques de gélose Mueller-Hinton. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures et le nombre d'unités formant colonies (UFC) a été enregistré (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009).

4.2. Analyse par microscopie électronique à balayage des biofilms formés sur les lentilles de contact

La topographie de surface des bactéries cultivées sous forme de biofilms (sur des lentilles de contact souples) et des cellules planctoniques a été étudiée à l'aide de SEM comme décrit précédemment. En bref, des biofilms bactériens utilisant les souches de référence recommandées par la FDA (*P. aeruginosa*, ATCC 9027 ; *S. marcescens*, ATCC 13880 ; et *S. aureus*, ATCC 6538) ont été formés jusqu'à la phase de maturité (18 heures) sur des lentilles de contact. Les lentilles de contact avec des biofilms matures ont été fixées avec du glutaraldéhyde à 2 %, suivies d'une fixation avec du tétr oxyde d'osmium, de l'acide tannique et de l'acétate d'uranyle. Ces étapes ont été suivies d'une série d'étapes de déshydratation de l'éthanol comme décrit précédemment, et les échantillons préparés ont été recouverts d'Au-Pd (rapport 60:40) et visualisés avec un microscope électronique à balayage d'émission modèle XL3C (ESEM) Microscope Philips (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009)

4.3. Analyses par microscopie confocale à balayage laser de l'architecture et de l'épaisseur du biofilm

L'architecture et l'épaisseur des biofilms formés à l'aide des souches de référence recommandées par la FDA sur les lentilles de contact ont été évaluées par microscopie confocale à balayage laser (CSLM).

En bref, les biofilms cultivés sur des lentilles de contact ont été transférés dans des plaques à 12 puits et colorés avec le kit de viabilité bactérienne LIVE/DEAD BacLight. Après incubation avec les colorants, les biofilms ont été placés sur une boîte de Petri à fond de verre de 35 mm

de diamètre. Les biofilms colorés ont été observés avec un microscope laser à balayage confocal Zeiss LSM 510 équipé de lasers argon et HeNe et monté sur un microscope Zeiss Axiovert100 M (Carl Zeiss, Inc). L'objectif utilisé était une lentille C-apochromatique à immersion dans l'eau (403 ; ouverture numérique de 1,2). Des mesures de profondeur ont été prises à intervalles réguliers sur toute la largeur de l'appareil. Pour les analyses orthogonales, une série de coupes optiques horizontales (xy) ont été obtenues sur toute la longueur du biofilm et analysées à l'aide du logiciel LSM 510 (Carl Zeiss). Des images confocales de fluorescence verte (ConA) et rouge (FUN-1) ont été conçues simultanément en utilisant un mode multipiste. Des cellules cultivées dans le plancton ont été utilisées comme comparateurs dans ces études (**Szczotka-Flynn *et al.*, 2009**).

Résultats et Discussion

1. Prélèvements et ensemencements

• Article 01

Pour la première étude de **Raksha et al., 2020**, les isolats bactériens obtenus à partir de la conjonctive, des lentilles de contact (lentilles de contact souples jetables mensuellement) et des étuis de stockage des lentilles des porteurs de lentilles de contact étaient : *S. aureus*, *Staphylocoque* à coagulase négative (CONS), *Pseudomonas*, Bacille à Gram négatif non fermentaire (NFGNB), *Bacillus spp*, *Diphthéroïdes*, *Micrococcus*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* et *Moraxella*. La distribution des isolats bactériens obtenus est illustrée dans la figure 8 (**Raksha et al., 2020**).

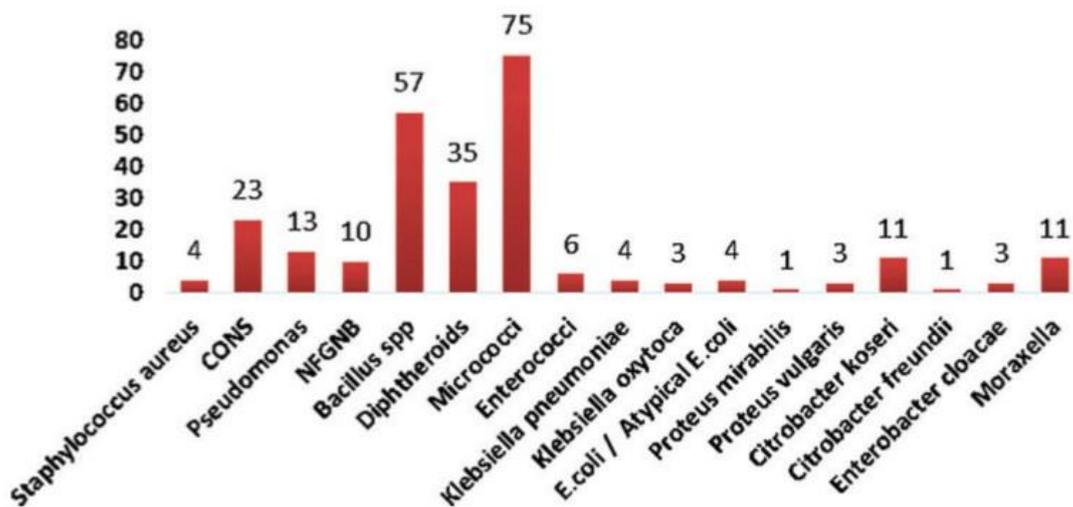


Figure 8 : Fréquence des isolats bactériens obtenus à partir de la conjonctive, Lentilles de contact (souples - jetables mensuellement) (**Raksha et al., 2020**).

Les biofilms sont la stratégie de survie des bactéries qui les aident à survivre dans des conditions environnementales difficiles. Ils ont la capacité de supporter une forte concentration d'agents antimicrobiens. À notre connaissance, il existe peu d'études analysant la capacité de la formation du biofilm des souches isolées de lentilles de contact.

Divers espèces bactériennes gram-positives (200) et gram-négatives (65) ont été obtenues à partir de la conjonctive, des lentilles de contact et de ses accessoires et évaluées pour leur capacité de former le biofilm *in vitro* par la méthode en tube et de RCA (**Raksha et al., 2020**).

2. Etude de la formation du biofilm par la méthode en tube et la méthode RCA

La formation du biofilm était considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvrait la paroi et le fond du tube. La formation d'anneaux à l'interface liquide n'était pas indicative de la formation de biofilm. Sur la base de l'intensité de la coloration, ils ont été caractérisés comme modérément positifs et fortement positifs (figure 9). Sur les 265 isolats, 53,5% étaient modérément positifs, 33,2% fortement positifs et 13,2% négatifs par la méthode en tube.

En comparaison avec les résultats d'une étude menée par **Mathur *et al.*, 2006** où la méthode en tube a identifié 18 (11,8 %) isolats comme producteurs du biofilm fort et 45 (29,6 %) étaient des producteurs du biofilm modéré, la présente étude a montré une proportion plus élevée de producteurs du biofilm. Dans une étude menée par **Afreenish Hassan *et al.*, 2011** parmi 110 isolats, 21 souches étaient de bonnes formatrices du biofilm, 33 étaient modérés et 56 étaient non formatrices du biofilm (**Raksha *et al.*, 2020**).



Figure 9: Détection du biofilm bactérien par la méthode en tube, montrant des résultats fortement positifs (a), modérément positifs (b) et négatifs (c) (**Raksha *et al.*, 2020**).

Et selon la technique RCA, les isolats étaient considérés comme fortement positifs lorsqu'il y avait présence de colonies noires à consistance cristalline sèche. Un assombrissement des colonies avec l'absence d'une morphologie coloniale cristalline sèche indique un producteur de biofilm modérément positif. Les colonies restées roses ont été désignées comme non productrices de biofilm (figure 10). Sur les 265 isolats, 36,6 % étaient modérément positifs, 40 % fortement positifs et 23,3 % négatifs ce qui est supérieur à d'autres études menées par **Mathur *et al.*, 2009**, **Hou *et al.*, 2012** et **Afreenish Hassan *et al.*, 2011** où le pourcentage de formation du biofilm par cette technique était respectivement de 3,4 %, 34,38 % et 3,6 %.

La corrélation entre la méthode RCA et la méthode en tube était de 75,8 % (valeur P = 0,006) (**Raksha et al., 2020**).



Figure 10: Détection du biofilm par la méthode Rouge Congo Agar, montrant des résultats fortement positifs (a), modérément positifs (b) et négatifs (c) (**Raksha et al., 2020**).

Le pourcentage de producteurs du biofilm dans cette étude était de 86,7 % par la méthode tube où la répartition des souches obtenus étaient : 44 des isolats de *Bacillus spp* obtenus parmi les 57 souches (77,1%), 22 des isolats *Diphthéroïdes* obtenus parmi les 35 souches (62,8%), 63 isolats de *Micrococcus* obtenus parmi 75 (84%) (**Raksha et al., 2020**).

Quand à la technique RCA. Le pourcentage de producteurs du biofilm étaient de 76,7 où la répartition des isolats bactériens obtenus étaient : 36 des isolats de *Bacillus spp* obtenus parmi les 57 souches, 21 des isolats *Diphthéroïdes* obtenus parmi les 35 souches (60%), 58 isolats de *Micrococcus* obtenus parmi 75 (77,3%).

Dans d'autres organismes bactériens, la plupart d'entre eux étaient des producteurs du biofilm. Au total, 86,9 % des isolats CONS étaient positifs pour la formation du biofilm (tableau 2), ce

qui est similaire aux études menées par **Catalanotti et al., 2005** où 74,1 % des souches de *S. epidermidis* étaient biofilm positives.

Tout les isolats de *Pseudomonas* (13/13 par méthode en tube et 12/13 par méthode RCA) obtenus étaient phénotypiquement positifs pour la formation du biofilm. **Oncel et al., 2010** ont rapporté que 60 % (6/10) des isolats de *P. aeruginosa* provenant de rhinosinusite chronique produisaient des biofilms bactériens. **Coban et al., 2009** ont également signalé que 33,3 % (20/60) des échantillons de *P. aeruginosa* testés pour la capacité de formation du biofilm des isolats chez les patients atteints de mucoviscidose étaient positifs au biofilm (**Raksha et al., 2020**).

Tableau 2 : Détection de la production du biofilm de bactéries isolées obtenues à partir de porteurs de lentilles de contact (**Raksha et al., 2020**).

| Organism | Frequency | Tube method Positive | Congo red method Positive |
|---|-----------|----------------------|---------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 4 | 4 | 4 |
| CONS | 24 | 22 | 20 |
| <i>Pseudomonas</i> | 13 | 13 | 12 |
| NFGNB | 10 | 9 | 11 |
| <i>Bacillus sp</i> | 57 | 44 | 36 |
| Diphtheroids | 35 | 22 | 21 |
| Micrococci | 75 | 63 | 58 |
| Enterococci | 6 | 5 | 4 |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | 5 | 7 | 7 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>E. coli</i> /Atypical <i>E. coli</i> | 4 | 4 | 4 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 0 | 0 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 11 | 10 | 5 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 1 | 1 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 3 | 3 | 3 |
| <i>Moraxella</i> | 11 | 10 | 8 |
| Total | 265 | | |

La méthode en tube a permis de détecter un grand nombre d'isolats positifs par rapport à la méthode RCA. Sur la base de cette expérience avec la méthode en tube et du RCA, l'interprétation des résultats était plus facile avec RCA car la méthode en tube était de nature subjective. La corrélation entre la méthode en tube et la méthode RCA dans cette étude était de 75,8 %. Par conséquent, nous suggérons que les méthodes phénotypiques (méthode en tube

et méthode RCA) peuvent être utilisées comme un moyen pratique pour détecter les infections liées au biofilm (Raksha *et al.*, 2020).

3. Confirmation par PCR de la formation du biofilm bactérien chez les porteurs de lentilles de contact

Sur les quatre isolats de *S. aureus*, deux (50 %) ont montré la présence du gène *icaA*. Parmi 23 isolats CONS, trois (13%) ont montré la présence du gène *icaA* (figure 11). Les isolats qui ont montré la présence du gène *icaA* étaient phénotypiquement positifs pour la formation du biofilm par les deux méthodes (méthode en tube et méthode RCA). Les isolats qui étaient phénotypiquement négatifs pour la formation du biofilm n'ont pas montré la présence du gène *icaA*. Tous les isolats de *Pseudomonas* étaient négatifs pour la présence du gène *pslA* (1119 bp), bien que la plupart d'entre eux aient été phénotypiquement positifs pour la formation du biofilm (Raksha *et al.*, 2020).

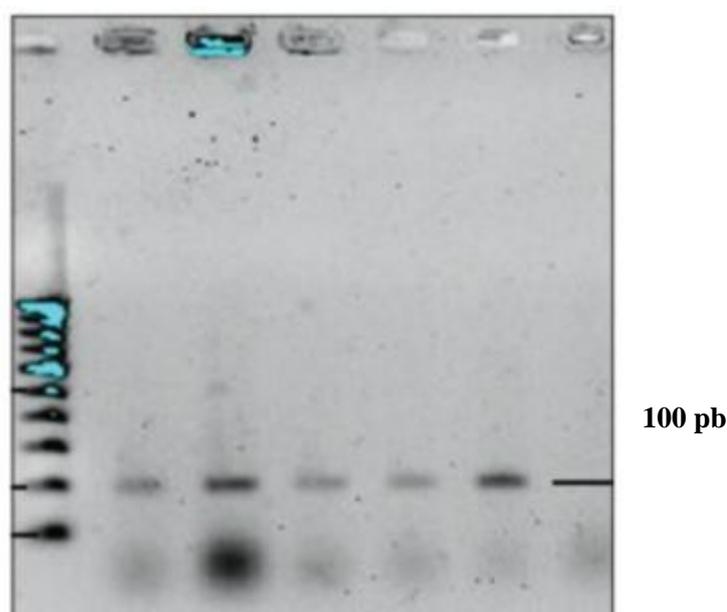


Figure 11 : Piste 1 - échelle d'ADN de 100 pb ; Piste 2-7 – Amplicon PCR Staph *icaA* (Raksha *et al.*, 2020).

La principale voie synthétique de formation du biofilm chez les espèces de *Staphylococcus* est codée par l'opéron *icaA* qui comprend quatre gènes, à savoir *ica A*, *D*, *B* et *C*. Par conséquent, *icaA* a été considéré comme le gène représentatif de l'opéron *icaA* dans cette étude. *S. aureus* et CONS ont été évalués pour la présence du gène *icaA* (188 pb) par PCR.

Sur 23 isolats CONS, trois (13 %) et deux isolats de *S. aureus* sur quatre (50 %) ont montré la présence du gène *icaA*. Ces résultats diffèrent de l'étude menée par **Hou et al., 2012** où 40,63% des souches de *Staphylococcus epidermidis* et 11,11% de *S. aureus* portaient le gène *icaA*. Ces résultats indiquent que la formation du biofilm nécessite un réseau complexe de facteurs tels que *icaC*, *icaD* et le gène *icaA* est probablement l'un des nombreux facteurs qui régulent la formation du biofilm. Les isolats qui étaient génotypiquement positifs pour le gène *icaA* étaient également phénotypiquement positifs pour la formation du biofilm par les deux méthodes (méthode tube et méthode RCA), ce qui est similaire à l'étude menée par **Suzuki Takashi et al., 2005**. Les isolats qui étaient phénotypiquement négatifs pour la formation du biofilm n'ont pas montré la présence du gène *icaA*.

Tout les isolats de *Pseudomonas* étaient négatifs pour la présence du gène *pslA* (1119 pb), mais la plupart d'entre eux étaient phénotypiquement positifs pour la formation du biofilm. Le résultat de notre étude est différent de l'étude menée par **Hou et al., 2012** où 31,03% des souches de *Pseudomonas* portaient le gène *pslA*. Les rapports précédents d'**Overhage et al., 2005** et **Colvin et al., 2011** ont suggéré un rôle essentiel pour le groupe de gènes *psl* dans l'étape initiale de la formation du biofilm de *P. aeruginosa*,

P. aeruginosa produit au moins trois polysaccharides (alginate, Pel et Psl) qui déterminent la stabilité de la structure du biofilm. Parmi les 60 systèmes à deux composants présents dans le génome de *P. aeruginosa*, le système GacS/GacA agit comme un super-régulateur du système QS et il est impliqué dans la production de multiples facteurs de virulence ainsi que dans la formation du biofilm. Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour détecter génotypiquement la production du biofilm par *Pseudomonas spp* car le processus de formation du biofilm est déterminé par l'interaction de nombreux groupes de gènes, dont certains n'ont pas encore été identifiés (**Raksha et al., 2020**).

- **Article 02**

4. Caractérisation du biofilm sur les lentilles de contact

4.1. Évolution de la cinétique d'adhésion sur les lentilles Lotrafalcon A

Pour évaluer l'évolution temporelle du développement du biofilm bactérien sur les lentilles lotrafalcon A, ils ont surveillé la formation du biofilm à 0, 2, 6, 18 et 24 heures en utilisant une culture quantitative. Comme le montre la figure 12, il y avait 3 schémas de croissance distincts pour chaque organisme.

La formation du biofilm par *P. aeruginosa* a progressé à travers une phase précoce caractérisée par une croissance rapide dans les 6 premières heures, suivie d'une phase intermédiaire où une croissance lente progressive a été notée (jusqu'à 18 heures). Après UN temps de 18 heures, la croissance du biofilm de *P. aeruginosa* a atteint la phase stationnaire.

La formation du biofilm par *S. marcescens* a suivi différentes cinétiques de croissance, avec une phase de latence initiale allant jusqu'à 2 heures, suivie d'une phase de croissance exponentielle rapide (entre 2 et 6 heures), atteignant un seuil critique. En revanche, la formation du biofilm par *S. aureus* était caractérisée par une augmentation progressive de la croissance jusqu'à 24 heures. Des biofilms cultivés jusqu'à 18 heures ont été utilisés dans des expériences ultérieures car, bien qu'il y ait des différences de cinétique, les biofilms formés par les 3 espèces ont atteint la phase de maturation à ce moment (**Szczotka-Flynn et al., 2009**).

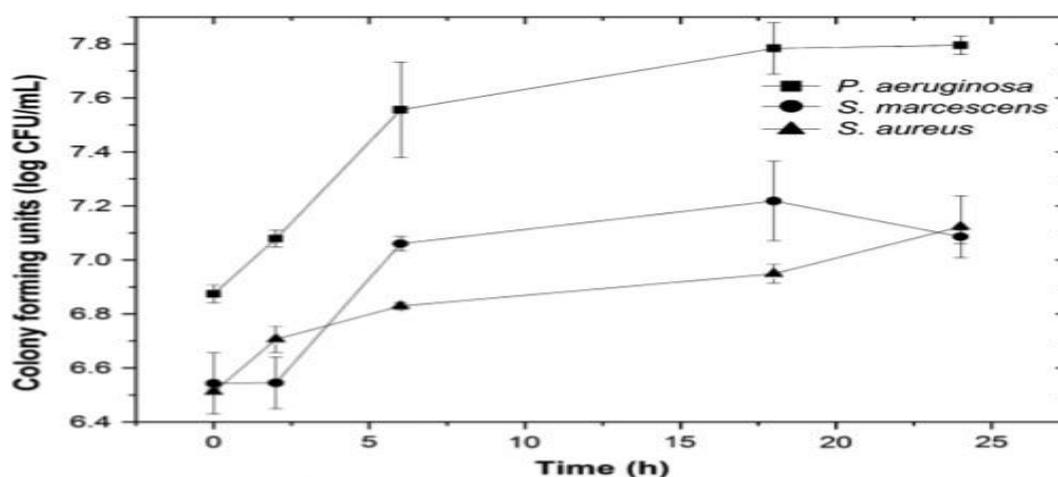


Figure 12 : Cinétique de croissance des biofilms formés par *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. aureus* sur des lentilles de contact en silicone hydrogel. La croissance du biofilm a été surveillée en déterminant le nombre d'UFC à chaque instant étudié (**Szczotka-Flynn et al., 2009**).

Dans cette étude, les auteurs ont développé un modèle reproductible *in vitro* de formation du biofilm bactérien sur des lentilles de contact en silicone lotrafilcon et ils ont démontré que *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. aureus* (agents étiologiques majeurs de infection et inflammation associées aux lentilles de contact) peuvent former des biofilms sur ce polymère de lentille de contact.

Plusieurs groupes ont étudié l'adhésion bactérienne aux surfaces des lentilles de contact et ont rapporté que ce processus est influencé par des variables telles que la température, les milieux

de culture, le matériau de la lentille, le revêtement de surface, etc [(Stapleton *et al.*, 1993) ; (Schultz *et al.*, 1995) ; (Andrews *et al.*, 2001)]. De plus ils ont montré que la formation de glycocalyx peut se produire dès les 30 minutes après l'adhésion de *P. aeruginosa* à des lentilles souples à faible perméabilité à l'oxygène (Dk). Cependant, il y a peu d'informations sur les modèles de biofilms matures liés aux lentilles de contact souples (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009). Il a été démontré que l'adhérence bactérienne est plus élevée sur les matériaux de lentilles de contact en silicone hydrogel que sur les hydrogels conventionnels [(Willcox *et al.*, 2001) (Henriques *et al.*, 2005); (Kodjikian *et al.*, 2007);] ce qui est susceptible d'avoir une pertinence clinique car des niveaux élevés de bactéries et de lentilles en silicone hydrogel ont été associés à certains événements inflammatoires [(Holden *et al.*, 1996) ; (Sankaridurg *et al.*, 1999) ; (Jalbert *et al.*, 2000) ; (Szczotka-Flynn et Diaz-Insua, 2007)].

À cet égard, Selan *et al.*, 2009 ont utilisé un test basé sur une plaque à 24 puits pour démontrer qu'en présence d'un milieu d'infusion cœur-cerveau (BHI), les lentilles de contact recouvertes de phosphorylcholine étaient plus résistantes à l'adhésion et à la colonisation bactériennes par rapport aux lentilles en poly(2 hydroxyéthyl méthacrylate) ou en silicone hydrogel.

Dans cette modèle *in vitro*, ils ont constaté que les biofilms formés par les 3 espèces atteignaient la phase de maturité à 18 heures, bien qu'avec des différences distinctes dans leur cinétique de croissance. Par exemple, la formation de biofilm par *P. aeruginosa* a progressé à travers des phases précoces, intermédiaires et matures, tandis que la formation du biofilm par *S. marcescens* présentait une phase latence, suivie d'une phase de croissance exponentielle, atteignant ensuite un seuil critique.

Enfin, les biofilms de *S. aureus* se caractérisent par une augmentation progressive de la croissance jusqu'à 24 heures. Des cinétiques de croissance différentielles de la formation de biofilms ont également été rapportées plus tôt pour les biofilms de *S. epidermidis* et d'*Enterococcus faecalis* formés dans des conditions variables d'écoulement hydrodynamique et ont démontré une croissance latente, dynamique/accélérée, linéaire et une phase mature pendant la formation du biofilm [(Baillif *et al.*, 2006); (Baillif *et al.*, 2008)]. Ces résultats suggèrent que la formation du biofilm sur les lentilles de contact par différentes bactéries passe par des phases de développement distinctes (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009).

4.2. Analyse par microscopie électronique à balayage des biofilms formés sur les lentilles de contact

Dans cette étude ils ont utilisé SEM pour évaluer la morphologie brute des biofilms bactériens formés sur les lentilles de contact. Leurs analyses ont révélé des morphologies typiques du biofilm pour les 3 souches bactériennes testés (Figure 14). Comme prévu, les biofilms de *Pseudomonas* présentaient un réseau dense de cellules disposées en plusieurs couches, formant des microcolonies, avec une matrice extracellulaire granulaire clairement visible (flèche, Figure 14A). Des topographies et des microcolonies similaires ont été observées dans les biofilms formés par *S. marcescens* et *S. aureus* (Figure 14C, E, respectivement). Les bactéries cultivées à l'état planctonique été principalement sous forme de monocouches, sans aucune preuve de matrice extracellulaire (Figure 14B, D, F) (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009).

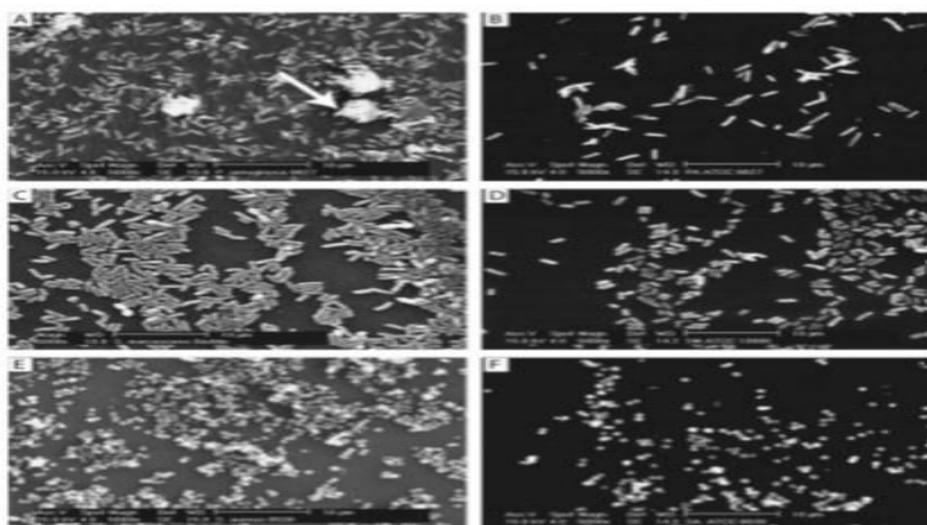


Figure 13 : Morphologie brute et topographie de surface des biofilms formés par *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. aureus*, par rapport aux cellules correspondantes à croissance planctonique. Le SEM a été réalisé pour évaluer la morphologie brute et la topographie de surface des biofilms formés par *P. aeruginosa* (A), *S. marcescens* (C) et *S. aureus* (E) après 18 heures d'incubation. B, D et F, cellules cultivées par plancton de ces 3 bactéries pendant 18 heures, respectivement. La flèche indique la matrice du biofilm. Grossissement 35000 (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009).

4.3. Analyses par microscopie confocal à balayage laser de l'architecture et de l'épaisseur du biofilm

Les analyses confocales ont révélé que les biofilms formés par les 3 espèces bactériennes présentaient une architecture hétérogène caractérisée par la présence d'amas denses de cellules viables entrecoupées de cellules non viables (Figure 15). La comparaison de l'épaisseur des biofilms formés par ces 3 espèces est présentée dans le tableau 4 et a révélé que *P. aeruginosa*

formait un biofilm significativement plus épais que *S. marcescens* et *S. aureus* (qui avait le biofilm le plus fin. Contrairement aux biofilms, les bactéries cultivées à l'état planctonique étaient présentes sous forme de cellules individuelles (données non présentées) (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009).

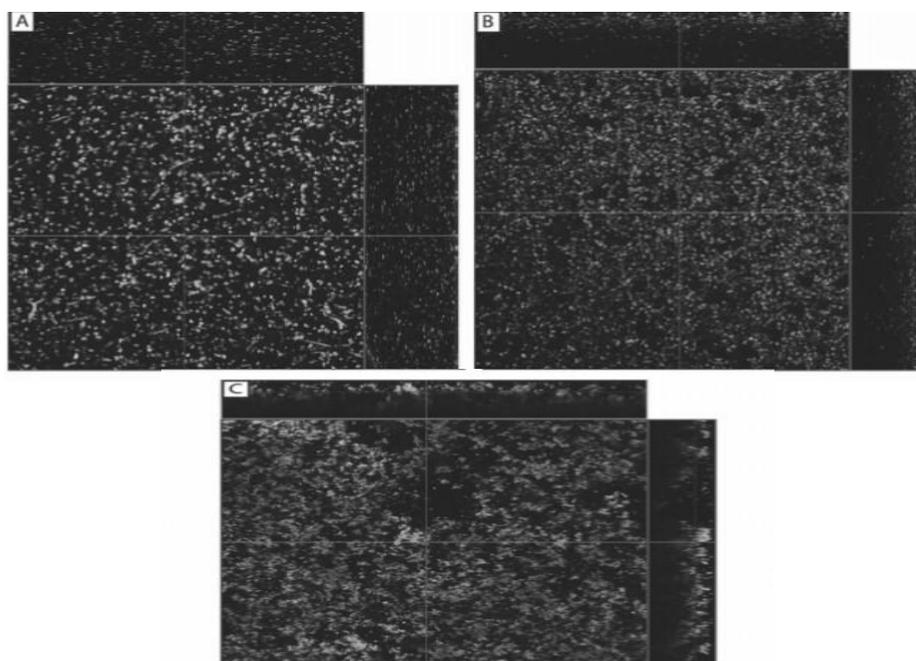


Figure 14 : Analyse confocale de l'architecture des biofilms formés par *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. aureus*. Les panneaux montrent une vue orthogonale des biofilms formés sur les lentilles de contact en silicone hydrogel par *P. aeruginosa* (A), *S. marcescens* (B) et *S. aureus* (C). Grossissement 340 (Szczotka-Flynn *et al.*, 2009).

Des études antérieures ont également utilisé le SEM et le CSLM pour évaluer l'adhérence bactérienne et les biofilms formés sur les lentilles de contact [(Slusher *et al.*, 1987) ; (Farber *et al.*, 1995) ; (McLaughlin-Borlace *et al.*, 1998); (Selan *et al.*, 2009)]. Les grappes de microcolonies observées dans les analyses SEM de cette étude étaient similaires à celles rapportées précédemment par McLaughlin-Borlace *et al.*, 1998 qui ont utilisé SEM pour évaluer la formation de biofilm sur les lentilles de contact et les étuis de stockage de lentilles de contact chez les patients atteints de kératite microbienne.

Ces chercheurs ont rapporté que les biofilms étaient présents plus fréquemment (85 %) sur les surfaces des étuis de stockage des lentilles que sur les surfaces des lentilles de contact (55 %). De plus, ces biofilms bactériens étaient composés d'amas de cocci et de bâtonnets fixés sur les

lentilles de contact, alors que les étuis de lentilles avaient des biofilms similaires mais plus étendus.

Selan et al., 2009 ont également utilisé CSLM pour montrer une adhérence et une colonisation réduites des bactéries sur les lentilles de contact revêtues de phosphorylcholine par rapport aux lentilles en silicone hydrogel et en poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle). L'architecture des biofilms bactériens rapportés par ces chercheurs était similaire à ceux observés dans cette étude. Une variable qui peut également avoir un impact sur la topographie et l'architecture des biofilms bactériens formés sur les lentilles de contact est de savoir si les lentilles sont portées (qui seraient exposées au film lacrymal pendant l'utilisation). Dans la présente étude, ils ont utilisé des lentilles de contact non portées et n'avons donc pas été exposés au film lacrymal. Il a été démontré que la formation d'un film de conditionnement composé de protéines lacrymales et d'autres matières organiques influence profondément les propriétés physicochimiques des surfaces biomédicales [(**Bruinsma et al., 2001**); (**Willcox et al., 2001**)]. L'effet du dépôt de film lacrymal sur la formation du biofilm de lentilles de contact est actuellement étudié à l'aide du modèle de biofilm bactérien in vitro décrit dans cette étude (**Szczotka-Flynn et al., 2009**).



Conclusion

Les lentilles de contact fournissent une surface où les microorganismes peuvent se fixer et coloniser la surface sous forme d'un biofilm, qui représente une source de propagation des microorganismes à un épithélium cornéen.

Ce travail, dans un premier temps nous a permis de montrer que sur 265 souches bactériennes, 53,5 % étaient modérément positifs, 33,2 % fortement positifs et 13,2 % négatifs pour la production du biofilm par TM et 36,6 % étaient modérément positifs, 40 % fortement positifs et 23,3 % négatifs pour la production du biofilm par RCA. Sur les 04 isolats de *S. aureus*, 02 ont montré la présence du gène *icaA*. Sur les 23 isolats CONS, 03 ont montré la présence du gène *icaA*. Tous les isolats de *Pseudomonas* étaient négatifs pour la présence du gène *pslA* bien que la plupart d'entre eux aient été phénotypiquement positifs pour la formation du biofilm.

Ces résultats ont révélé que la plupart des souches bactériennes obtenues à partir des lentilles de contact étaient suffisamment potentiels pour produire des biofilms. La méthode en tube et la méthode RCA ont montré une corrélation statistique significative et ont détecté un bon nombre d'isolats formant un biofilm, et donc peuvent être utilisées pour la détection de la production du biofilm. L'absence de gène formant un biofilm n'exclut pas la possibilité d'une production phénotypique de biofilm par des bactéries (**Raksha et al., 2020**).

Dans un deuxième temps, toutes les souches bactériennes de références et cliniques sélectionnées : *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. aureus* ont formé des biofilms sur les lentilles en silicone hydrogel lotrafilcon A sous forme de réseaux denses de cellules disposées en plusieurs couches avec une matrice extracellulaire visible et donc cette étude nous a permis de suggérer que les événements indésirables associés aux lentilles en silicone hydrogel peuvent être liés à la propension des bactéries à adhérer et à former des biofilms (**Szczotka-Flynn et al., 2009**).

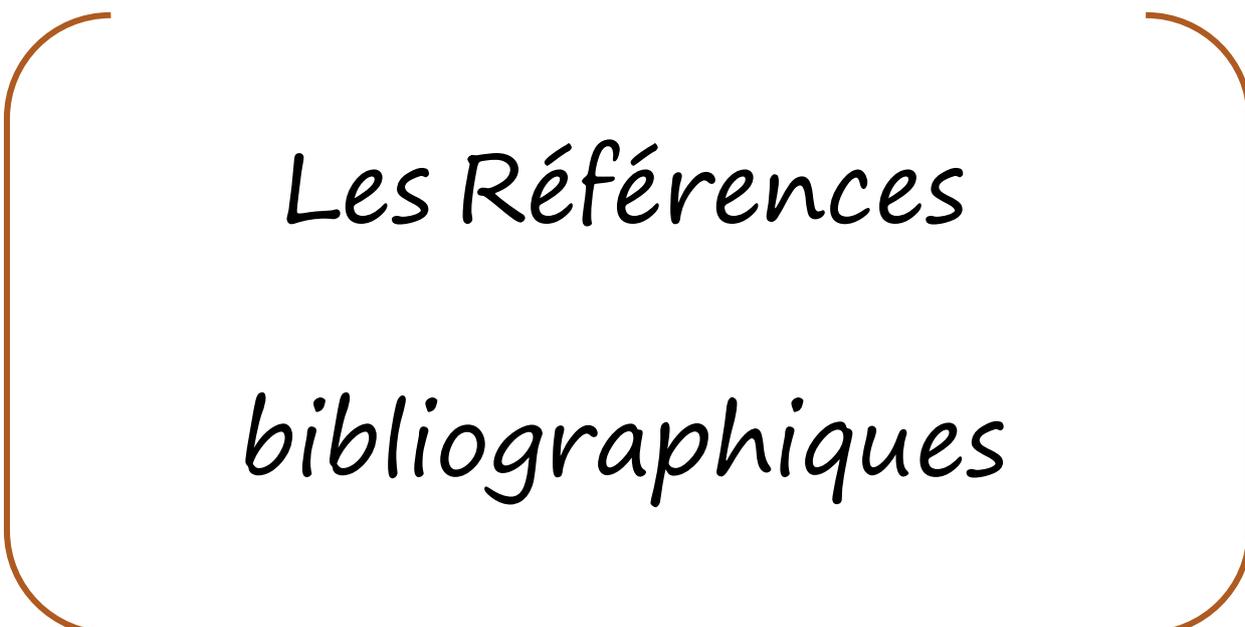
Enfin nous disons que des bonnes conditions pratiques d'hygiène sont très nécessaires pour éviter l'adhésion des microorganismes et la formation du biofilm. Donc tous les porteurs des lentilles de contact doivent prendre en considération à un certain nombre de conseils et des règles d'hygiène pour éviter le risque d'infectieux :

- Avant toute manipulation, les mains et les ongles doivent se laver soigneusement avec des savons doux et sans parfum car les savons parfumés peuvent laisser des dépôts sur les lentilles, et les sécher avec un tissu propre et non pelucheux.
- Ne pas rincer les lentilles par l'eau du robinet ou la salive.

- Il faut respecter la fréquence de renouvellement et la durée du port préconisées par l'ophtalmologiste et le fabricant (journalier ou continu).
- Il faut respecter les règles de bonnes hygiènes corporelles et environnementales .
- Ne pas laisser de solution dans les étuis, ce dernier doivent être régulièrement renouvelés à chaque changement de flacon de produit.

Il faut encourager l'information du consommateur et l'observance de l'entretien : « **il faut se souvenir que la lentille est renouvelable, la cornée ne l'est pas** » .

Pierre Lumbroso.



*Les Références
bibliographiques*

A

Amankwah S., Abdella K. et Kassa T. (2021). Bacterial Biofilm Destruction: A Focused Review On The Recent Use of Phage-Based Strategies With Other Antibiofilm Agents. *Nanotechnology, Science and Applications*, 14, 161–177.

Andrews C. S., Denyer S. P., Hall B., Hanlon G. W. et Lloyd A. W. (2001). A comparison of the use of an ATP-based bioluminescent assay and image analysis for the assessment of bacterial adhesion to standard HEMA and biomimetic soft contact lenses. *Biomaterials*, 22(24), 3225–3233.

Astley R., Miller F. C., Mursalin M. H., Coburn P. S. et Callegan M. C. (2019). An Eye on *Staphylococcus aureus* Toxins: Roles in Ocular Damage and Inflammation. *Toxins*, 11(6), 356.

B

Baillif S., Casoli E., Marion K., Roques C., Pellon G., Hartmann D. J., ... Kodjikian L. (2006). A Novel In Vitro Model to Study Staphylococcal Biofilm Formation on Intraocular Lenses under Hydrodynamic Conditions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(8), 3410-3416.

Baillif S., Ecochard R., Casoli E., Freney J., Burillon C. et Kodjikian L. (2008). Adherence and kinetics of biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* to different types of intraocular lenses under dynamic flow conditions. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 34(1), 153–158.

Benton A. H. et Marquart M. E. (2018). The Role of Pneumococcal Virulence Factors in Ocular Infectious Diseases. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1-9.

Berthélémy S. (2015). Le port des lentilles de contact. *Actualités Pharmaceutiques n° 547*, 37-40.

Bezoui M. (2016). Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine (*Thèse de Doctorat en pharmacie*). Université mohammed v-rabat.

Bjorn V., Soutar C., Irsch K., Guyton D. L., Burrows A. M., Cohn J. F., ... Savvides M. (2009). Anatomy of Eyes. *Encyclopedia of Biometrics*, 11–16.

Bloise L., Labetoulle M. et Malet F. (2019). Les avancées en contactologie.

https://www.sfo-online.fr/sites/www.sfo-online.fr/files/medias/documents/rapport_les_avancees_en_contactologie.pdf

Bloise L. (2017). Surveillance, hygiène et entretien des lentilles de contact. *Journal français d'ophtalmologie*, 40, 329-337.

Bouheraoua N., Labbé A., Chaumeil C., Liang Q., Laroche L. et Borderie V. (2014). Kératites amibiennes. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 37(8), 640–652.

Bourcier T., Bouheraoua N., Gomart G., Gueudry J., Dory A., Prevost G., ...Labetoulle M. (2020). Kératite bactérienne. *EMC - Ophtalmologie*, 37(1), 1-12.

Bourcier T., Chatel M. A., Chaumeil C., Borderie V. et Laroche L. (2007). Kératites bactériennes. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Ophtalmologie*, 1-9.

Bourcier T., Sauer A., Dory A., Denis J. et Sabou M. (2017). Kératites fongiques. *Journal Français d'ophtalmologie*, 40(10), 882-888.

Brown L., Leck A. K., Gichangi M., Burton M. J. et Denning D. W., (2021). The global incidence and diagnosis of fungal keratitis. *Lancet Infect Dis*, 21, 49–57.

Bruinsma G. M., van der Mei H.C. et Busscher H. J. (2001). Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*, 22, 3217–3224

C

Cabrera Aguas M. P. (2019). Development, implementation and evaluation of evidence-based treatment guidelines for herpes simplex keratitis (*A thesis submitted to fulfil requirements for the degree of Doctor of Philosophy*). *The University of Sydney*.

Catalanotti P., Lanza M. et Del Prete A. (2005). Slime-producing *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact lens wearers. *New Microbiol*, 28, 345-54.

Castano G., Elnahry A. G. et Mada P. K. (2020). Fungal keratitis. *StatPearls - NCBI Bookshelf*, 1-11. [PubMed: 29630244]

Christensen G. D., Simpson W. A., Bisno A. L. et Beachy E. H. (1982). Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surface. *Infection and Immunity*, 37, 318-326.

Coban A. Y., Ciftci A., Onuk E. E., Erturan Z., Tanriverdi Cayci Y. et Durupinar B. (2009). Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis [in Turkish]. *Mikrobiyol Bul*, 43, 563-73.

Colliot J. P. (2019). Principes d'adaptation d'une lentille cornéenne rigide perméable au gaz sur une cornée régulière. *Les Cahiers d'Ophtalmologie*, 226, 38-43.

Colvin K. M., Irie Y., Tart C. S., Urbano R., Whitney J. C., Ryder C., ... Parsek M. R. (2011). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1913–1928.

D

Donlan R. M. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881–890.

Dosler S., Hacıoglu M., Yilmaz F. N. et Oyardi O. (2020). Biofilm modelling on the contact lenses and comparison of the in vitro activities of multipurpose lens solutions and antibiotics. *The open access journal for life and environment*. 8, e9419.

Dutta D. et Willcox M. (2013). A Laboratory Assessment of Factors That Affect Bacterial Adhesion to Contact Lenses. *Biology*, 2(4), 1268–1281.

Dyavaiah M., Phaniendra A. et Sudharshan S. J. (2015). Microbial Keratitis in Contact Lens Wearers. *JSM Ophthalmol*, 3(3):1036.

E

Efron N. (2010). *Soft lens materials*. Dans C. Maldonado-Codina (dir.), *Contact lens practice* (2nd éd., p. 70-73). Butterworth-Heinemann Elsevier , Oxford, Uk; St. Louis, Mo.

Egrilmez S. et Yildirim-Theveny S. (2020). Treatment-Resistant Bacterial Keratitis: Challenges and Solutions. *Clinical Ophthalmology*, 14, 287–297.

F

Fanselow N., Sirajuddin N., Yin X. -T., Huang A. J. W. et Stuart P. M. (2021). *Acanthamoeba* Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. *Pathogens*, 10, 323.

Farber B. F., Hsieh H.-C., Donnenfeld E. D., Perry H. D., Epstein A. et Wolff A. (1995). A Novel Antibiofilm Technology for Contact Lens Solutions. *Ophthalmology*, 102(5), 831–836.

Fleiszig S. M. J., Kroken A. R., Nieto V., Grosser M. R., Wan S. J., Metrucchio M. M. E. et Evans D. J. (2019). Contact lens-related corneal infection: Intrinsic resistance and its compromise. *Progress in Retinal and Eye Research*, 76, 100804.

Freeman D. J., Falkiner F. R. et Keane C. T. (1989). New method of detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42, 87-84.

G

Galas S. et Copper L. L. (2016). Oxygen permeability of the pigmented material used in cosmetic daily disposable contact lenses. *Clinical Ophthalmology*, 10, 2469–2474.

Guillon M. (2013). Are Silicone Hydrogel Contact Lenses More Comfortable Than Hydrogel Contact Lenses?. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 39(1), 85–91

Guzmán-Soto I., McTiernan C., Gonzalez-Gomez M., Ross A., Gupta K., Suuronen E. J., ... Alarcon E. I. (2021). Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience*, 24(5), 102443.

H

Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A. et Iqbal M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis [Internet]*, 15, 305-11.

Hawas S., Verderosa A. D. et Totsika M. (2022). Combination Therapies for Biofilm Inhibition and Eradication: A Comparative Review of Laboratory and Preclinical Studies. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 850030.

Henriques M., Sousa C., Lira M., Elisabete M., Oliveira R., Oliveira R. et Azeredo J. (2005). Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to Silicone Hydrogel Contact Lenses. *Optometry and Vision Science*, 82(6), 446–450.

Holden B. A., La Hood D., Grant T., Newton-Howes J., Baleriola-Lucas C., Willcox M. D. et Sweeney D. F. (1996). Gram-negative bacteria can induce contact lens related acute red

eye (CLARE) responses. *The CLAO Journal : Official Publication of the Contact Lens Association of Ophthalmologists, Inc*, 22(1), 47-52.

Hou W., Sun X. Wang Z. et Zhang Y. (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, 5624-31.

J

Jalbert I., Willcox M. D. et Sweeney D. F. (2000). Isolation of *Staphylococcus aureus* from a contact lens at the time of a contact lens-induced peripheral ulcer: case report. *Cornea*, 19, 116–120.

Jain A. et Agarwal A. (2009). Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiology and Methods*, 76, 88-92.

K

Kackar S., Suman E. et Kotian M. S. (2017). Bacterial and fungal biofilm formation on contact lenses and their susceptibility to lens care solutions. *Indian J Med Microbiol*, 35:80-4.

Kalishwaralal K., BarathManiKanth S., Pandian S. R. K., Deepak V. et Gurunathan S. (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 340–344.

Karygianni L., Ren Z., Koo H. et Thurnhee T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol*, 28(8), 668-681.

Kodjikian L., Casoli-Bergeron E., Malet F., Janin-Manificat H., Freney J., Burillon C., ... Steghens, J.-P. (2007). Bacterial adhesion to conventional hydrogel and new silicone-hydrogel contact lens materials. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246(2), 267–273.

Konduri R., Saiabhilash C. R. et Shivaji S. (2021). Biofilm-Forming Potential of Ocular Fluid *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on Ex Vivo Human Corneas from Attachment to Dispersal Phase. *Microorganisms*, 9(6), 1124.

L

Liu X. Cao B., Yange L. et Gu J-D. (2022). Biofilm control by interfering with c-di-GMP metabolism and signaling. *Biotechnology Advances*, 56, 107915.

Lagina O. D. A. (2016). Beware the Biofilm.

M

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D. J., Fatma T. et Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol*, 24, 25-9.

McGlinchey S. M., McCoy C. P., Gorman S. P. et Jones D. S. (2008). Key biological issues in contact lens development. *Expert Review of Medical Devices*, 5(5), 581–590.

McLaughlin-Borlace L., Stapleton F., Matheson M. et Dart j. K. G. (1998). Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 827–838.

Mlyniuk P., Stachura J., Jiménez-Villar A., Grulkowski I. et Kaluzny B. J. (2021). Changes in the geometry of modern daily disposable soft contact lenses during wear. *Scientific Reports*, 11, 12460.

Mordmuang A., Udomwech L. et Karnjan K. (2021). Influence of Contact Lens Materials and Cleaning Procedures on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Clinical Ophthalmology*, 15, 2391–2402.

Moreddu R., Vigolo D. et Yetisen A. K. (2019). Contact Lens Technology: From Fundamentals to Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 1900368.

Muhammad M. H., Idris A. L., Fan X., Guo Y., Yu Y., Jin X., ... Huang T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches . *Front Microbiol*, 11, 928.

Musgrave C. S. A. et Fang F. (2019). Contact Lens Materials: A Materials Science Perspective. *Materials*, 12(2), 261.

N

Nasr S. A., AbuShady H. M. et Hussein H. S. (2012). Biofilm formation and presence of *ica* AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 1110-8630.

Nicolson P. C. et Vogt J. (2001). Soft contact lens polymers. *An evolution Biomaterials*, 22, 3273–3283.

O

Olufayo O., et Abou-El-Hossein K. (2015). Evolution of High Precision Manufacturing of Contact Lenses. *Materials Science Forum*, 828-829, 374–380.

Oncel S., Pinar E., Sener G., Calli C. et Karagoz U. (2010). Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 39, 52-5.

O'Toole G. A., Kaplan H. B. et Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.

Overhage J., Schemionek M., Webb J.S. et Rehm B. H. (2005). Expression of the *psl* operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms: *pslA* performs an essential function in biofilm formation. *Appl Environ Microb*, 71, 4407-13.

P

Pinto R. M., Soares F. A., Reis S., Nunes C. et Van Dijck P. (2020). Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix in Bacterial Biofilms. *Front Microbiol*, 11, 952.

Prasannakumary C. et Jyothy P. T. (2017). Complications of contact lens. *Kerala Journal of Ophthalmology*, 29(2), 68-71.

R

Raksha L., Gangashettappa N., Shantala G.B., Nandan B.R. et Sinha D. (2020). Study of biofilm formation in bacterial isolates from contact lens wearers. *Indian Journal Ophthalmol* 68(1), 23-8.

Randler C. Matthes R., McBain A. J., Giese B., Fraunholz M., Sietmann R., ... Kramer A. (2010). A three-phase in-vitro system for studying *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses. *BMC Microbiology*, 10(1), 282.

Rodriguez-Garcia A. et Hernandez-Camarena J. C. (2021). Contact Lens-Associated Infectious Keratitis: Update on Diagnosis and Therapy. Dans Alamillo-Velazquez, J., Ruiz-Lozano, E. R., Hernandez-Camarena, J. C. et Rodriguez-Garcia, A. (dir.), *Infectious Eye Diseases: Recent Advances in Diagnosis and Treatment (2^{ème} éd, p. 3-34)*. London : IntechOpen.

Rossos A. K., Bantia C. N., Kalampouniasb A. G., Papachristodoulouc C., Kordatosd K., Zoumpoulakise P., ... Hadjikakoua S. K. (2020). pHEMA@AGMNA-1: A novel material for the development of antibacterial contact lens. *Materials Science & Engineering C*, 111, 110770.

Roth H. W., Malet F. et Cavanagh H. (2005). Complications des lentilles de contact . Paris : Elsevier Masson, 214 p.

Roux A., et Ghigo J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 261-268.

Roy R., Tiwari M., Donelli G. et Tiwaria V. (2017). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522–554.

S

Salman M., Rizwana R., Khan H., Munir I., Hamayun M., Iqbal A., ...Amin F. U. (2019). Synergistic effect of silver nanoparticles and polymyxin B against biofilm produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates of pus samples *in vitro*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2465-2472.

Samrot A. V., Abubakar Mohamed A., Faradjeva E., Si Jie L., Hooi Sze C., Arif A., ... Kumar S. S. (2021). Mechanisms and Impact of Biofilms and Targeting of Biofilms Using Bioactive Compounds—A Review. *Medicina (Kaunas)*, 57(8), 839.

Sánchez Ferreir A. V., Calleja G. G., Nunez M. C. et Bellido L. M. (2012). Evolution and history of contact lenses. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 87(8), 263–266.

Sankaridurg P. R., Sharma S., Willcox M., Sweeney D. F., Naduvilath T. J., Holden B. A. et Rao G. N. (1999). Colonization of hydrogel lenses with *Streptococcus pneumoniae*: risk of development of corneal infiltrates. *Cornea*, 18(3), 289-295.

Savin E. (2004). Port de lentilles de contact et kératites d'origine infectieuse : 14 cas diagnostiques au chu de nantes de juin 2001 a décembre 2003 (*thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie*). *Universite de nantes* .

Schalk O. (2017). *La contactologie à l'officine : complications liées au port des lentilles de contact et modalités d'entretien (thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie)*. *Université de lorraine*.

- Schultz C. L., Pezzutti M. R., Silor D. et White R. (1995).** Bacterial adhesion measurements on soft contact lenses using a Modified Vortex Device and a Modified Robbins Device. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 243–247.
- Selan L., Palma S., Scoarughi G. L., Papa R., Veeh R., Di Clemente D. et Artini M. (2009).** Phosphorylcholine Impairs Susceptibility to Biofilm Formation of Hydrogel Contact Lenses. *American Journal of Ophthalmology*, 147(1), 134–139.
- Shrestha L., Fan H. M., Tao H. R. et Huang J.D. (2022).** Recent Strategies to Combat Biofilms Using Antimicrobial Agents and Therapeutic Approaches. *Pathogens*, 11(3), 292.
- Slusher M. M., Myrvik Q. N., Lewis J. C., et Gristina A. G. (1987).** Extended-Wear Lenses, Biofilm, and Bacterial Adhesion. *Archives of Ophthalmology*, 105(1), 110–115.
- Srinivasan M., MS, Mascarenhas J., MS DNB; Prashanth C. N., MS. (2008).** Distinguishing infectious versus noninfectious keratitis. *Indian Journal of Ophthalmology*, 56(3),203-7.
- Srinivasan R., Santhakumari S., Poonguzhali P., Geetha M., Dyavaiah M. et Xiangmin, L. (2021).** Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Front Microbiol*, 12, 676458.
- Stapleton F., Dart J. K., Matheson M., et Woodward E. G. (1993).** Bacterial adherence and glycocalyx formation on unworn hydrogel lenses. *Journal of The British Contact Lens Association*, 16(3), 113–117.
- Suzuki T., Kawamura Y., Uno T., Ohashi Y. et Ezaki T. (2005).** Prevalence of *Staphylococcus epidermidis* strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. *Am J Ophthalmol*, 140, 844-50.
- Szczotka-Flynn L. B., Imamura Y., Chandra J., Yu C., Mukherjee P. K., Pearlman E. et Ghannoum M. A. (2009).** Increased Resistance of Contact Lens–Related Bacterial Biofilms to Antimicrobial Activity of Soft Contact Lens Care Solutions. *Cornea*, 28(8), 918-926.

T

Țălu Ș., Țălu M., Giovanzana S. et Shah R. (2011). A brief history of contact lenses. *HVM Bioflux*, 3(1), 33-37.

U

Udomwech L., Karnjana K., Jewboonchu J., Rattanathamma P., Narkkul U., Juhong J. et Mordmuang A. (2022). Bacterial microbiota of the contact lens surface and associated care behaviours. *Heliyon* e09038, 8(3).

Ung L. et Chodosh J. (2021). Foundational concepts in the biology of bacterial keratitis. *Experimental Eye Research*, 209, 108647.

Uruén C., Chopo-Escuin G., Tommassen J., Mainar-Jaime R. C. et Arenas J. (2020). Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics (Basel)*, 10(1), 3.

Urwin L., Okurowska K., Crowther G., Roy S., Garg P., Karunakaran E., ... Monk P. N. (2020). Corneal Infection Models: Tools to Investigate the Role of Biofilms in Bacterial Keratitis. *Cells*, 9(11), 2450.

V

Van der Worp E., Barnett M. et Johns L. (2018). Scleral lenses: History & future. *Contact Lens and Anterior Eye*, 41(3), 243–244.

Vivero-Lopez M., Muras A., Silva D., Serro AP., Otero A., Concheiro A. et Alvarez-Lorenzo C. (2021). Resveratrol-Loaded Hydrogel Contact Lenses with Antioxidant and Antibiofilm Performance. *Pharmaceutics*, 13(4), 532.

W

Willcox M. D. P., Harmis N., Cowell B. A., Williams T. et Holden B. A. (2001). Bacterial interactions with contact lenses; effects of lens material, lens wear and microbial physiology. *Biomaterials*, 22(24), 3235–3247.

X

Xiao A., Dhand C., Leung C. M., Beuerman R. W., Ramakrishna S., et Lakshminarayanan R. (2018). Strategies to design antimicrobial contact lenses and contact lens cases. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(15), 2171–2186.

Y

Yin W., Xu S., Wang Y., Zhang Y., Chou S.-H., Galperin M. Y., He J. (2020). Ways to control harmful biofilms: prevention, inhibition, and eradication. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(1), 57–78.

Z

Zachary Jordan A. (2021). A Review of Current and Novel Approaches for Treatment of Keratitis (*Submitted to the Graduate Faculty of the School of Pharmacy of the requirements for the degree of Master of Science*). University of Pittsburgh.

Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V. et Hacker J. (2001). Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*, 336, 195-203.