



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2011/07/01
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2012/01/05
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2012/12/28
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2011/061156
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2012/001164
(30) Priorités/Priorities: 2010/07/02 (EP10305725.3);
2010/08/31 (EP10305928.3)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A01N 63/02* (2006.01),
A01P 1/00 (2006.01), *C09D 5/16* (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
IFREMER-INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE
POUR L'EXPLOITATION DE LA MER, FR
(72) Inventeur/Inventor:
GUEZENNEC, JEAN, FR
(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : EXOPOLYSACCHARIDES POUR LA PREVENTION ET LA LUTTE CONTRE LA FORMATION DE BIOFILMS
(54) Title: EXOPOLYSACCHARIDES FOR PREVENTING AND CONTROLLING THE FORMATION OF BIOFILMS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne des exopolysaccharides de préférence obtenus par fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds en tant qu'agents de prévention de la formation, sur une surface, de biofilms indésirables. L'invention concerne également un procédé de protection d'une surface par prévention de la formation du film primaire conduisant à des biofilms indésirables, dans lequel on met en contact ou l'on greffe ladite surface avec au moins un exopolysaccharide selon l'invention. L'invention concerne en outre un procédé de modification des caractéristiques physique d'une surface de telle manière que l'adhésion d'un biofilm bactérien indésirable sur ladite surface se trouve limitée.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
5 janvier 2012 (05.01.2012)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/001164 A1(51) Classification internationale des brevets :
C09D 5/16 (2006.01) *C09D 199/00* (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01) *A01N 43/02* (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2011/061156(22) Date de dépôt international :
1 juillet 2011 (01.07.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
10305725.3 2 juillet 2010 (02.07.2010) EP
10305928.3 31 août 2010 (31.08.2010) EP(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
IFREMER (INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER) [FR/FR]; 155 rue Jean-Jacques Rousseau, F-92138 Issy-les-Moulineaux (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) :
GUEZENEC, Jean [FR/FR]; 17 rue d'Ouessant, F-29280 Plouzane (FR).(74) Mandataire : **ICOSA**; 83 avenue Denfert-Rochereau, F-75014 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : EXOPOLYSACCHARIDES FOR PREVENTING AND CONTROLLING THE FORMATION OF BIOFILMS

(54) Titre : EXOPOLYSACCHARIDES POUR LA PRÉVENTION ET LA LUTTE CONTRE LA FORMATION DE BIOFILMS

(57) Abstract : The invention relates to exopolysaccharides, preferably obtained by fermenting bacteria from deep hydrothermal ecosystems, serving as agents for preventing the formation of unwanted biofilms on a surface. The invention also relates to a method for protecting a surface by preventing the formation of the primary film leading to unwanted biofilms, wherein the method includes placing said surface in contact with at least one exopolysaccharide of the invention, or grafting the exopolysaccharide of the invention onto said surface. The invention also relates to a method for modifying the physical properties of a surface such that the adhesion of an unwanted bacterial biofilm to said surface is reduced.

(57) Abrégé : L'invention concerne des exopolysaccharides de préférence obtenus par fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds en tant qu'agents de prévention de la formation, sur une surface, de biofilms indésirables. L'invention concerne également un procédé de protection d'une surface par prévention de la formation du film primaire conduisant à des biofilms indésirables, dans lequel on met en contact ou l'on greffe ladite surface avec au moins un exopolysaccharide selon l'invention. L'invention concerne en outre un procédé de modification des caractéristiques physique d'une surface de telle manière que l'adhésion d'un biofilm bactérien indésirable sur ladite surface se trouve limitée.

WO 2012/001164 A1

EXOPOLYSACCHARIDES POUR LA PRÉVENTION ET LA LUTTE CONTRE LA FORMATION DE BIOFILMS

5

[Domaine de l'invention]

La présente invention concerne le domaine de la prévention de biofilms de microorganismes indésirables. Plus particulièrement, l'invention propose un procédé de traitement de surface en vue de protéger ladite surface contre l'adhésion intempestive de biofilms indésirables, le procédé selon l'invention mettant en œuvre des exopolysaccharides. Selon l'invention, la surface à traiter est mise en contact, ponctuellement ou à intervalles régulier, avec des exopolysaccharides, de préférence en solution, qui sont capables de former sur cette surface un film protecteur d'exopolysaccharides.

Un biofilm est une communauté de microorganismes, notamment du type bactérie, champignon, algue ou protozoaire, adhérant entre eux et à une surface. La production de biofilm est caractérisée par la sécrétion d'une matrice qui est susceptible d'adhérer à de nombreux types de surface, notamment minéraux, métaux, verres, résines synthétiques. Les biofilms sont généralement observés dans des milieux aqueux ou humides.

Le phénomène d'adhésion d'un biofilm indésirable se déroule en plusieurs séquences :

1. Formation d'un film primaire qui va conditionner la surface. Ce film primaire est formé de matières organiques présentes dans le milieu ;
2. Adhésion réversible des micro-organismes par des liaisons chimiques non-covalentes ou faibles ;
3. Adhésion permanente des micro-organismes facilitée par la production d'exopolymères saccharidiques ou de protéines ou glycoprotéines qui constituent des points d'ancrage pour une colonisation ultérieure de plus grande ampleur. Le film de micro-organismes fixés de façon permanente sur une surface constitue le biofilm au sens de la présente invention ;

4. En milieu marin, la colonisation d'une surface par un biofilm peut permettre, à terme, l'attachement d'organismes supérieurs (balanes, moules, et plus généralement macro-organismes et macro-salissures).

5 **[Problème technique]**

La formation de biofilms peut avoir de nombreuses conséquences tant dans le domaine industriel, que dans le domaine environnemental ou celui de la santé, notamment de la santé publique. La présente invention peut donc trouver une application dans des domaines variés.

10 Dans le domaine industriel, les biofilms induisent des corrosions, diminuent l'échange thermique dans les échangeurs et provoquent des résistances à l'écoulement dans les tubes et tuyaux. Dans le domaine de la santé, il est reconnu que la formation de biofilms pourrait être à l'origine de nombreux cas de maladies nosocomiales, notamment lorsque du biofilm se fixe sur du matériel chirurgical de type cathéter ou dans les systèmes
15 de climatisation ou de réfrigération.

L'invention s'intéresse particulièrement à la formation de biofilms sur toute surface susceptible d'être colonisée en milieu naturel, notamment en milieu marin. Dans le milieu marin, il est connu que presque toutes les surfaces immergées en milieu marin sont sujettes au développement d'un biofilm. La présence de ce biofilm est à l'origine de
20 nombreux problèmes dans le domaine océanographique et pour les activités marines. Les moyens de lutte employés contre les salissures installées sont souvent toxiques (notamment biocides) et peuvent avoir des conséquences désastreuses vis-à-vis de la faune et de la flore de l'environnement marin. D'autre part, les nettoyages réguliers de surfaces augmentent considérablement les coûts d'exploitation des industries marines.

25 Il existe donc un réel besoin de développer des approches alternatives aux traitements traditionnels contre les salissures et les biofilms indésirables.

La présente invention présente un intérêt particulier en ce qu'elle agit au niveau des premières étapes du phénomène d'adhésion, à savoir la prévention de la formation de film primaire et/ou la modification de sa structure et de sa composition, et la prévention de
30 l'adhésion réversible, prévenant de fait les étapes ultérieures d'adhésion permanente de biofilm indésirable, puis d'accrochage de macro-organismes sur ce biofilm.

[État de la technique]

Il existe des agents anti-salissures dans l'état de la technique. Par exemple, US 7,090,856 décrit un agent anti-salissures qui est non toxique, et bénin pour l'environnement marin. Cet agent est issu de *Vibrio alginolyticus* ou *Vibrio proteolyticus*.

5 Il peut être constitué par le surnageant d'une fermentation de ces bactéries, qui est ensuite dessalé et généralement concentré. Il peut être utilisé seul ou dans des compositions de peinture, de béton ou de revêtement. Il peut être utilisé sur des surfaces marines sous forme de revêtement permanent ou d'un spray ou liquide de rinçage. Il inhibe l'adhésion de larves de macro-organismes du type notamment balane ou polychètes. Toutefois, US 10 7,090,856 ne décrit ni ne suggère la prévention d'agent de prévention du film primaire qui est à l'origine de l'adhésion réversible dans un premier temps, puis permanente, des microorganismes. US 7,090,856 ne décrit pas non plus la prévention spécifique de l'adhésion des microorganismes sur les surfaces. Au contraire, US 7,090,856 décrit la prévention de la fixation de macro-organismes, par une action sur l'adhésion des larves de 15 macro-organismes au biofilm indésirable déjà constitué.

De même, la demande de brevet EP 1 170 359 décrit une gelée biologique comprenant des polysaccharides produite par une souche du genre *Alteromonas*. EP 1 170 359 décrit que ladite gelée inhibe l'attachement de macro-organismes sur une surface. EP 1 170 359 ne décrit pas la prévention de l'adhésion de micro-organismes sur 20 une surface.

Il est connu de l'homme du métier que la présence de microorganismes fixés sur une surface est un préalable à la fixation de macro-organismes sur ladite surface. Par contre, il est également connu que la présence d'un biofilm microscopique n'entraîne pas 25 automatiquement la fixation de macro-organismes. Ainsi, l'absence de fixation de macro-organismes ne signifie pas qu'il n'y a pas de biofilm sur une surface. EP 1 170 359 décrit en effet une surface sur laquelle sont fixées des bactéries SHY1-1 produisant un polysaccharide, ledit polysaccharide inhibant l'attachement des macro-organismes sur ladite surface.

30

Par ailleurs, WO9607752 décrit des exopolysaccharides de la famille des *Hyphomonas* comme agent de liaison avec un métal, pour purifier des eaux desdits métaux.

A la connaissance de la Demanderesse, aucun document de l'art antérieur ne décrit ni ne suggère d'agent, qui soit à la fois respectueux de l'environnement, et qui aie le pouvoir de prévenir efficacement, et en parfait respect de l'environnement, la formation de
5 film primaire ou d'un biofilm microscopique indésirable sur une surface d'un matériau.

[Résumé]

Un objet de la présente invention est l'utilisation d'exopolysaccharides (EPS) en tant qu'agent de prévention de la formation, sur une surface, d'un biofilm microscopique.

10 Dans un mode de réalisation, lesdits EPS comprennent des oses neutres, de préférence glucose, rhamnose, mannose ou galactose ; des oses acides, de préférence des acides uroniques tels que acide glucuronique, acide galacturonique ou acide hexuronique ; des oses aminés, de préférence N acétyl glucosamine ou N acétyl galactosamine ; des sulfates et/ou des protéines.

15 Dans un autre mode de réalisation, lesdits EPS sont obtenus par fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds.

Dans un autre mode de réalisation, lesdites bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds sont du genre *Alteromonas* ou *Pseudoalteromonas*.

20 Dans un autre mode de réalisation, lesdits exopolysaccharides sont obtenus par fermentation de bactéries *Alteromonas macleodii* ou *Alteromonas infernus*.

Dans un autre mode de réalisation, lesdits exopolysaccharides sont choisis parmi HYD 657, HYD 1644, HYD 1545, GY 785, MS 907, ST 716, HYD 721, GY 772, HYD 750, GY 768, GY 788, BI746, GY 786, GY 685, GY 686, ST 719, HYD 1574, HYD 1579, HYD 1582, HYD 1584, ST 708, ST 722, ST 342, ST 349, HYD 1625, et HYD 1666.

25 Dans un autre mode de réalisation, lesdits exopolysaccharides sont associés à l'acide zostérique ou à l'un de ses dérivés.

Dans un autre mode de réalisation, lesdits exopolysaccharides sont associés à un ou plusieurs PAM.

30 Un autre objet de l'invention est un procédé de protection d'une surface par prévention de la formation d'un biofilm microscopique, comprenant l'utilisation d'exopolysaccharides tels que décrits ci-dessus, caractérisé en ce que l'on forme un film protecteur d'exopolysaccharides sur ladite surface par mise en contact ou greffage de ladite

surface avec au moins un exopolysaccharide.

Dans un mode de réalisation, ledit procédé comprend en outre une étape de suivi de la formation ou de l'état du film d'exopolysaccharides résultant de la mise en contact ou du greffage de ladite surface avec au moins un exopolysaccharide par tout moyen physico-
5 chimique adapté.

Dans un autre mode de réalisation, ladite surface est métallique, en ce que ledit moyen physicochimique est la mesure de la variation de potentiel électrochimique de ladite surface.

Dans un autre mode de réalisation, la mise en contact est effectuée ponctuellement
10 ou à intervalles réguliers, de préférence par injection d'une solution d'EPS de concentration de 0.001 à 10%, de préférence 0.01 à 1% en poids par rapport au volume total de la solution, à proximité d'une surface.

Un autre objet de l'invention est un procédé de modification des caractéristiques physiques d'une surface de telle manière que l'adhésion d'un biofilm bactérien indésirable
15 sur ladite surface se trouve limitée, comprenant l'utilisation d'exopolysaccharides tels que décrits ci-dessus, caractérisé en ce que l'on met en contact ou l'on greffe ladite surface avec un exopolysaccharide.

Un autre objet de l'invention est une surface recouverte d'exopolysaccharides, obtenue par utilisation d'exopolysaccharides tels que décrits ci-dessus, ou par le procédé
20 tel que décrit ci-dessus.

Un autre objet de l'invention est un produit comprenant une surface tel que décrite ci-dessus.

Dans un mode de réalisation, ledit produit est une canalisation ou un terminal méthanier.

25 Dans un autre mode de réalisation, ledit produit est un outil hospitalier, de préférence un tube ou un cathéter.

[Description détaillée]

Ainsi, l'invention concerne l'utilisation d'exopolysaccharides (EPS) comme agent
30 de prévention de la formation de biofilms indésirables.

Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, la Demanderesse suggère que la formation d'un film d'exopolysaccharides sur une surface modifie la composition et/ou la

structure du film primaire. Le film primaire formé en présence d'EPS est dénommé ci-après « film primaire modifié ». Les bactéries du milieu aqueux seraient alors incapables de se fixer sur ce film primaire modifié. La présence d'EPS sur la surface inhiberait ainsi la formation du biofilm microscopique.

5 Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS remplacent en partie les molécules de matière organique dans le film primaire modifié. Selon ce mode de réalisation, le film primaire modifié est formé de matières organiques et d'EPS.

 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le film primaire modifié est formé uniquement d'EPS. Selon ce mode de réalisation, les EPS sont également utiles
10 comme agent de prévention de la formation, sur une surface, du film primaire conduisant à des biofilms indésirables.

 Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS utilisés dans la présente invention comprennent des oses neutres, des oses acides, des oses aminés, des sulfates
15 et/ou des protéines. Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS utilisés dans la présente invention consistent en des oses neutres, des oses acides, des oses aminés, des sulfates et/ou des protéines.

 Des exemples d'oses neutres incluent, mais ne sont pas limités à, glucose, rhamnose, mannose, galactose, ...

20 Des exemples d'oses acides incluent, mais ne sont pas limités à, acides uroniques et notamment acide glucuronique, acide galacturonique, acide hexuronique tel que l'acide hexuronique de structure furanique substitué sur son carbone en position 3 par un résidu lactyle...

 Des exemples d'oses aminés incluent, mais ne sont pas limités à, N acétyl
25 glucosamine et N acétyl galactosamine, ...

 Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS comprennent entre 30 et 95% d'oses neutres, de préférence entre 40 et 90%, encore plus préférentiellement entre 45 et 88% d'oses neutres, en nombre d'oses par rapport au nombre total d'oses dans l'EPS.

 Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS comprennent entre 1 et 70%
30 d'oses acides, de préférence entre 5 et 60%, encore plus préférentiellement entre 8 et 53% d'oses acides, en nombre d'oses par rapport au nombre total d'oses dans l'EPS.

 Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS comprennent moins de 30%

d'oses aminés, de préférence moins de 20%, encore plus préférentiellement moins de 12% d'oses aminés, en nombre d'oses par rapport au nombre total d'oses dans l'EPS.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS comprennent moins de 50 molécules de sulfates pour 100 oses, de préférence moins de 40 molécules de sulfate, encore plus préférentiellement moins de 35 molécules de sulfate pour 100 oses dans l'EPS.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS comprennent moins de 50 protéines pour 100 oses, de préférence moins de 40 protéines, encore plus préférentiellement moins de 37 protéines pour 100 oses dans l'EPS.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS ne comprennent pas d'aminoarabinose, d'aminoribose, d'heptose et/ou de xylose.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les EPS utilisés ont une masse moléculaire supérieure à 500 kDa, de préférence supérieure à 800 kDa, plus préférentiellement supérieure à 1000 kDa, encore plus préférentiellement supérieure à 2000 kDa.

Suivant un mode de réalisation préféré, les exopolysaccharides (EPS) de l'invention sont obtenus par fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds. Plus particulièrement, les EPS de l'invention sont ceux synthétisés dans des conditions contrôlées (déséquilibre nutritionnel généré par un rapport Carbone/Azote élevé dû à un milieu nutritionnel enrichi en carbohydrates) lors de la fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds (voir par exemple Guezennec, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 29: 204-208).

Suivant un premier mode de réalisation, ces EPS sont choisis parmi HYD 657, HYD 1644, HYD 1545, GY 785, MS 907, ST 716, HYD 721, GY 772, HYD 750, GY 768, GY 788, BI746, GY 786, GY 685, GY 686, ST 719, HYD 1574, HYD 1579, HYD 1582, HYD 1584, ST 708, ST 722, ST 342, ST 349, HYD 1625, et HYD 1666.

Suivant un second mode de réalisation, ces EPS sont choisis parmi ceux synthétisés par des bactéries du genre *Alteromonas* ou *Pseudoalteromonas*, conformément

à la taxonomie en vigueur au jour de la présente invention. Si la taxonomie devait être modifiée, l'homme du métier pourrait adapter les modifications de taxonomie pour en déduire les EPS de l'invention. Avantageusement, ces bactéries sont des bactéries *Alteromonas macleodii*, et dans ce mode de réalisation, de préférence l'EPS est HYD 657.

5 Suivant un troisième mode de réalisation, ces bactéries sont des bactéries *Alteromonas infernus*, et dans ce mode de réalisation, de préférence l'EPS est GY 785. De préférence l'EPS est HYD1545 ou HYD1644.

La présente invention concerne également un procédé. Le procédé selon
10 l'invention est un procédé de protection d'une surface par prévention de la formation de biofilm bactérien indésirable sur ladite surface, dans lequel on forme un film protecteur d'exopolysaccharides sur ladite surface par mise en contact ou greffage de ladite surface avec au moins un exopolysaccharide selon l'invention.

Suivant un mode de réalisation préféré pour la mise en œuvre du procédé de
15 l'invention, les EPS sont en solution dans un solvant polaire, de préférence de l'eau. Suivant un mode de réalisation particulier, la concentration d'EPS dans la solution est de 0,001 à 10%, de préférence 0,01 à 1%, très préférentiellement, 0,02 à 0,5%, encore plus préférentiellement environ 0,02% en poids/volume, par rapport au volume total de la solution.

20 De préférence, dans le procédé de l'invention, on met en contact ladite surface avec une solution d'EPS telle que décrite ci-dessus.

Cette mise en contact ou ce greffage ont pour conséquence la formation d'un film homogène sur ladite surface. Selon un mode de réalisation de l'invention, le film d'EPS est continu sur ladite surface. Selon un mode de réalisation de l'invention, le film d'EPS a une
25 épaisseur de 0.1 à 100 µm, de préférence de 0.5 à 25 µm, préférentiellement de 1 à 10 µm.

Les conditions favorisant la formation d'un film homogène d'EPS sur les surfaces sont de préférence les suivantes :

- Température comprise entre 5 et 30°C, de préférence de 10 à 25°C.
- Solution de 0,001 à 10%, de préférence 0,01 à 1%, très
30 préférentiellement, 0,02 à 0,5%, encore plus préférentiellement environ 0.02%,
soit 200 mg/l en poids/volume, par rapport au volume total de la solution.

- durée de mise en contact de 10 secondes à 5 heures, de préférence de 1 à 120 minutes, plus préférentiellement de 3 à 60 minutes, encore plus préférentiellement de 5 à 30 minutes.

5 Suivant un premier mode de réalisation, la mise en contact est effectuée en milieu d'eau de mer circulante.

 Suivant un second mode de réalisation, la mise en contact ou le greffage est réalisé préalablement à l'exposition de la surface aux conditions de formation de biofilm indésirable, par exemple mais non exclusivement, préalablement à une immersion en milieu d'eau de mer. De préférence, le greffage est effectué sur des petites surfaces, du type notamment capteurs. Le greffage pourrait permettre une meilleure tenue des EPS à la surface qu'une simple mise en contact, et assurer ainsi une protection prolongée de la surface greffée. Le greffage peut être mis en œuvre par toute méthode connue de l'homme du métier, notamment du type de celle décrite dans WO2008078052.

15 Selon l'invention, le procédé peut comprendre des moyens de suivi, notamment par des méthodes physico-chimiques, du pouvoir filmant des EPS, de leur stabilité dans le temps de manière à en optimiser l'utilisation et éviter tout risque d'hétérogénéité de surface propre à encourager des risques, notamment pour les surfaces métalliques (métaux et alliages), des risques de corrosion.

20 Suivant un mode de réalisation particulier, le procédé selon l'invention comprend une étape de suivi de la formation du film d'exopolysaccharides résultant de la mise en contact ou du greffage de ladite surface avec au moins un exopolysaccharide selon l'invention, par tout moyen physico-chimique adapté. En particulier, le suivi de la formation du film d'EPS sur des surfaces métalliques (métaux et alliages) peut être mesuré par des mesures électrochimiques notamment, mais non exclusivement, par la mesure du potentiel électrochimique des alliages ou métaux de la surface, ledit potentiel électrochimique et la variation de ce potentiel étant mesurés par rapport à une électrode de référence.

25 En effet, lors de la mise en contact des EPS avec la surface et pendant la formation du biofilm d'EPS, le potentiel électrochimique des alliages ou métaux de la surface varie. Ce potentiel électrochimique devient stable lorsque le film est homogène.

Ainsi, suivant un mode de réalisation particulier, lorsque la surface est métallique, on mesure de la variation de potentiel électrochimique du métal après la première mise en contact avec les exopolysaccharides, et la mise en contact de la surface métallique avec les EPS selon le procédé de l'invention (mise en contact avec les EPS en solution, ou greffage) est poursuivie jusqu'à ce que le potentiel électrochimique de la surface se stabilise.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, on poursuit les mesures, et lorsque le potentiel électrochimique de la surface se déstabilise, on reprend la mise en contact avec les EPS jusqu'à stabilisation, à nouveau, du potentiel électrochimique. En effet, l'altération du film protecteur peut induire une variation de ce potentiel électrochimique traduisant un risque de colonisation bactérienne et par voie de conséquence une obligation de refilmer ces mêmes surfaces par remise en contact avec les EPS. Ainsi, suivant un mode de réalisation, le procédé selon l'invention comprend en outre une étape de suivi de l'état du film d'exopolysaccharide, permettant de déclencher, si nécessaire, c'est-à-dire si le film n'est pas homogène ou se dégrade, la remise en contact de la surface avec des EPS. Lorsque la surface est métallique, la déstabilisation du film peut être mesurée et suivie par la variation du potentiel électrochimique de la surface.

L'invention a donc également pour objet un procédé de contrôle de la présence d'un film protecteur sur une surface métallique, dans lequel on mesure le potentiel électrochimique de ladite surface. Suivant un mode de réalisation préféré, une variation d'au moins -10% du potentiel électrochimique d'une surface métallique sur une période de temps donnée (1-30 minutes) induit la remise en contact de la surface avec des EPS. Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, l'appareil de mesure du potentiel électrochimique de la surface est couplé à un appareil d'injection d'EPS, de telle manière qu'une valeur-seuil préenregistrée sur l'appareil de mesure du potentiel électrochimique déclenche la mise en contact de la surface avec une quantité donnée d'EPS. Selon un mode de réalisation préféré, la mise en contact s'effectue par injection d'une solution d'EPS à proximité de la surface à traiter.

Ainsi, selon le procédé de l'invention, la mise en contact des EPS avec la surface est de préférence renouvelable, et de préférence renouvelée, notamment sur une surface métallique lorsque le potentiel électrochimique de la surface effectue une variation d'environ 10%.

Le procédé de l'invention conduit à une réduction significative de l'adhésion bactérienne sur les surfaces étudiées donc de la formation du biofilm indésirable.

La Demanderesse a de fortes présomptions selon lesquelles le procédé de l'invention aurait un mécanisme de nature physique et que l'action des exopolysaccharides sur la prévention du film primaire ne serait pas de nature chimique : ainsi, l'invention s'inscrit dans une démarche de respect de l'environnement, et évite tout impact sur la flore bactérienne.

Selon la présente invention, le film d'EPS déposé par le procédé de l'invention modifie les caractéristiques physiques de la surface, par exemple en modifiant les caractéristiques du film primaire. Ainsi, le procédé selon l'invention est également un procédé de modification des caractéristiques d'adhésion d'un biofilm bactérien indésirable sur une surface, par modification des caractéristiques physique de ladite surface du fait du dépôt d'un film d'exopolysaccharides. L'invention a donc pour objet un procédé de modification des caractéristiques physique d'une surface de telle manière que l'adhésion d'un biofilm bactérien indésirable sur ladite surface se trouve limitée, lesdites caractéristiques physique de la surface susceptibles d'être modifiées pouvant être : le potentiel zeta ou le potentiel électrochimique ; l'angle de contact ; l'hydrophilie ; et les caractéristiques acide-base de Lewis.

La présente invention est particulièrement avantageuse en ce que les EPS respectent parfaitement l'environnement, n'ont aucun effet antimicrobien et ne sont pas biocides. Il est à noter que la présente invention ne constitue pas un de nettoyer une surface, ni un moyen de dissoudre ou de lutter contre un biofilm bactérien indésirable déjà installé.

25

La présente invention concerne également une surface recouverte par un film d'EPS tel que décrit ci-dessus, ou obtenue selon le procédé de protection de surface tel que décrit ci-dessus. Selon un mode de réalisation, ladite surface est métallique, minérale, telle que, par exemple, des ciments et des bétons, ou plastique.

La présente invention a également pour objet un produit comprenant une surface recouverte par un film d'EPS telle que décrite ci-dessus.

30

Selon un mode de réalisation, les EPS selon l'invention sont utiles dans le domaine industriel, tels que les terminaux marins, notamment les terminaux méthaniers, les canalisations d'eau microbiologiquement active, les circuits d'eaux de mer ou d'eau douce... Selon ce mode de réalisation, les produits comprenant une surface recouverte par un film d'EPS incluent, mais ne sont pas limités à, des tubes et conduits de canalisations, des plateformes, notamment de terminaux méthaniers.

Selon un autre mode de réalisation, les EPS selon l'invention sont utiles dans le domaine de la santé, et notamment de la santé publique. Selon ce mode de réalisation, les produits comprenant une surface recouverte par un film d'EPS incluent, mais ne sont pas limités à, des tubes et cathéters, des seringues, des outils chirurgicaux, des instruments médicaux.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le film d'EPS peut-être associé à un agent renforçant son action d'inhibition de la formation des biofilms.

Suivant un mode de réalisation, l'agent associé au film d'EPS et renforçant son action d'inhibition de la formation des biofilms est l'acide zostérique. L'acide zostérique est décrit comme permettant la prévention de la formation de biofilms sur des surfaces (US 5,384,176, US5,607,741, incorporés par référence).

Suivant un mode de réalisation, l'acide zostérique est natif. Suivant un autre mode de réalisation, l'acide zostérique peut être un dérivé modifié chimiquement, préférentiellement un dérivé de l'acide zostérique est un ester d'acide zostérique tel que décrit dans US2007/128151, incorporée par référence. Suivant un mode de réalisation préféré, le dérivé de l'acide zostérique est un dérivé acide de l'acide zostérique.

Suivant un mode de réalisation, l'acide zostérique est extrait de l'algue *Zostera marina*.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le film d'EPS peut être associé à des agents antimicrobiens, tels que, par exemple, des peptides antimicrobiens (PAM). Selon ce mode de réalisation, le film d'EPS associé aux agents antimicrobiens possède des effets antimicrobiens, permettant d'accentuer l'effet d'inhibition de colonisation de surfaces. Une telle activité est notamment utile dans le domaine de la santé.

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des molécules effectrices de l'immunité innée, conservées au cours de l'évolution et répandues dans tout le règne vivant. Une grande variété de PAMs a été identifiée au cours des dernières années, révélant une grande diversité en termes de structures, tailles et modes d'action. Les PAMs sont généralement
5 caractérisés par une forte représentativité en acides aminés cationiques et hydrophobes. Ces molécules ont le plus souvent un caractère amphiphile essentiel pour leur interaction avec les membranes bactériennes (Bulet et al. 2004). Les PAMs tuent les microorganismes, soit en perméabilisant leur membrane par un effet de type détergent ou par la formation de pores, soit par le blocage de la synthèse de peptidoglycane composant la paroi bactérienne,
10 soit encore par l'inhibition des voies métaboliques bactériennes (Brodgen et al., 2005).

Par rapport aux antibiotiques chimiques, généralement utilisés, les PAM présentent l'avantage d'être totalement biodégradables. Ils apparaissent comme de bons candidats en substitution aux antibiotiques chimiques conventionnels, du fait de leurs propriétés biologiques. En effet, ils présentent un large spectre d'activité antimicrobienne, peu de
15 spécificité, différents modes d'actions et une innocuité sur le milieu.

Les PAMs peuvent être produits par synthèse chimique ou par l'expression en système recombinant (clonage, expression, purification) bactérien ou levure.

Suivant un mode de réalisation de l'invention, les PAM peuvent appartenir à la famille des PAM linéaires à hélice alpha, à la famille des PAM présentant une
20 surreprésentation en un ou plusieurs acides aminés, à la famille des PAM à épingles à cheveux (bêta Hairpin) avec 1 ou 2 ponts disulfures, à la famille des PAM cycliques à feuillet bêta et hélice alpha avec 3 ponts disulfure ou plus (Bulet et al., Immunological reviews, 2004, 198 : 169-184 ; Brogden, Nature Review Microbiology, 2005, 3 :238-250).

Des exemples de PAM linéaires à hélice alpha incluent, mais ne sont pas limités à,
25 cécropine, stomoxyne, ponéricine, spinigérine, l'oxyopinine, la cupiennine, clavanine, styeline, pardaxine, misgurine, pleurocidine, parasine, oncorhyncine, moronécidine, magainine, temporine, cathelicidine et indolicidine.

Des exemples de PAM enrichis en un ou plusieurs acides aminés, proline, arginine, glycine, ou tryptophane, incluent, mais ne sont pas limités aux bacténicines, PR-39,
30 abaecines, apidaecines, drosocine, pyrrhocorinines, Cg-Prp, prophenine et indolicine.

Des exemples de PAM en épingles à cheveux contenant 2 à 4 cysteines incluent, mais ne sont pas limités à, la tachyplesine, la protégrine, la thanatine, l'androctonine, la

gomesine, la polyphemusine, l'hepcidine, la brevinine, l'esculentine, la tigerinine ou la batenecine.

Des exemples de PAM cycliques contenant 6 ou plus résidus de cystéines ou à cycle ouvert incluent, mais ne sont pas limités à, défensines (de vertébrés, invertébrés ou
5 plantes), termicine, héliomicine, drosomycine, ASABF, pBD, pénaeidines, ALF et big-défensines.

Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le PAM est la tachyplesine ou une défensine.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les PAM sont synthétisés par synthèse
10 chimique. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les PAM sont synthétisés par synthèse biologique en système recombinant bactérien ou fongique et de préférence, en système levure.

Selon un mode de réalisation, la surface recouverte du film d'EPS est mise en contact avec une solution comprenant un ou plusieurs PAM à une concentration de 1 à 10
15 CMI.

Selon l'invention, les PAM peuvent être en solution dans un solvant polaire biologiquement acceptable tel que l'eau, l'éthanol, le trifluoroéthanol ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, TFE) ou leur mélange comme par exemple eau/TFE, de préférence le trifluoroéthanol ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$).

20 Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en contact est réalisée à une température constante, préférentiellement de 1 à 10 °C, plus préférentiellement environ 4 °C.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la mise en contact est réalisée pendant 24 à 120 heures, préférentiellement pendant 48 à 96 heures, plus
25 préférentiellement 72 heures.

[Définitions]

Par **EPS**, on entend les exopolysaccharides synthétisés dans des conditions contrôlées (déséquilibre nutritionnel généré par un rapport Carbone/Azote élevé dû à un
30 milieu nutritionnel enrichi en carbohydrates) lors de la fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds, en particulier mais non exclusivement, les EPS suivants :

Référence EPS	Origine	Oses neutres	Oses acides	Oses amines	Sulfates	Protéines
HYD 657	Hydrothermale profond	58	30	0	5	2
HYD 1644	id	38	32	0	10	5
HYD 1545	id	49	34	0	11	1
GY 785	id	51	37	0	6	4
MS 907	id	50	37	0	0	0
ST 716	id	46	41	2	5	4
HYD 721	id	57	11	0	8	3
GY 772	id	43	50	2	0	3
HYD 750	id	44	16	2	5	16
GY 768	id	37	37	2	8	2
GY 788	id	30	28	3	8	5
BI746	id	34	18	6	8	4
GY 786	id	37	32	4	5	6
GY 685	id	61	8	1	11	2
GY 686	id	46	8	2	15	7
ST 719	id	56	10	3	18	7
HYD 1574	id	66	9	1	13	3
HYD 1579	id	52	8	4	13	3
HYD 1582	id	49	12	3	16	9
HYD 1584	id	52	10	4	14	8
ST 708	id	49	8	1	10	12
ST 722	id	49	8	3	13	8
ST 342	id	42	7	2	17	18
ST 349	id	50	5	2	9	16
HYD 1625	id	46	40	2	13	4
HYD 1666	id	48	36	1	10	6

Les compositions relatives de ces EPS sont indiquées dans le tableau suivant :

Référence EPS	Oses neutres ¹	Oses acides ¹	Oses amines ¹	Sulfates ²	Protéines ²
HYD 657	65.91	34.09	0	5.68	2.27
HYD 1644	54.29	45.71	0	14.29	7.14
HYD 1545	59.04	40.96	0	13.25	1.20
GY 785	57.95	42.05	0	6.82	4.55
MS 907	57.47	42.53	0	0	0
ST 716	51.69	46.07	2.25	5.62	4.49
HYD 721	83.82	16.18	0	11.76	4.41
GY 772	45.26	52.63	2.11	0	3.16
HYD 750	70.97	25.81	3.23	8.06	25.81
GY 768	48.68	48.68	2.63	10.53	2.63
GY 788	49.18	45.90	4.92	13.11	8.20
BI746	58.62	31.03	10.34	13.79	6.90
GY 786	50.68	43.84	5.48	6.85	8.22
GY 685	87.14	11.43	1.43	15.71	2.86
GY 686	82.14	14.29	3.57	26.79	12.50
ST 719	81.16	14.49	4.35	26.09	10.14
HYD 1574	86.84	11.84	1.32	17.11	3.95
HYD 1579	81.25	12.50	6.25	20.31	4.69
HYD 1582	76.56	18.75	4.69	25	14.06
HYD 1584	78.79	15.15	6.06	21.21	12.12
ST 708	84.48	13.79	1.72	17.24	20.69
ST 722	81.67	13.33	5	21.67	13.33
ST 342	82.35	13.73	3.92	33.33	35.29
ST 349	87.72	8.77	3.51	15.79	28.07
HYD 1625	52.27	45.45	2.27	14.77	4.55
HYD 1666	56.47	42.35	1.18	11.76	7.06

¹ : les quantités relatives sont indiquées en % d'oses par rapport au nombre total d'oses dans l'EPS

² : les quantités relatives sont indiquées en nombre de molécules pour 100 oses dans l'EPS.

5 Par « **solution d'EPS** », on entend une solution formée par un solvant polaire, et un EPS ou un mélange d'EPS.

Par « **surface** », on entend la superficie, ou la partie extérieure d'une masse de matériau qui peut être d'origine synthétique, typiquement un matériau polymérique ou un matériau d'origine minérale, typiquement du verre ou du béton, ou qui peut être un métal,
10 en particulier cuivre, le titane ; les surfaces métalliques préférées sont inox 316L, le titane, l'Inconel 600, le nickel, le laiton amirauté, et le chrome.

Par « **film primaire** », on entend un film conditionnant composé de protéines ou de fragments protéiques, de glucides, de lipides, de matières minérales comme par exemple

des sels minéraux, issus du milieu environnant. Ce film primaire stimule l'adhésion bactérienne.

Par « **biofilm indésirable** », on entend un film de microorganismes, généralement des bactéries, qui viennent s'accrocher au film primaire, dans une première étape d'adhésion réversible puis irréversible. Dans le sens de la présente invention, un biofilm est constitué de micro-organismes. Les termes « **biofilm** », « **biofilm microscopique** », « **biofilm bactérien** » et « **biofilm indésirable** » sont interchangeables. Ainsi, les macro-organismes fixés à une surface ne forment pas un biofilm au sens de la présente invention.

Par « **greffage** », on entend tout moyen de fixation des EPS selon l'invention sur une surface.

Par « **angle de contact** », on entend l'angle auquel une interface liquide rencontre une surface solide. L'angle de contact est mesuré par un goniomètre. La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le matériau, avec la surface du matériau. Elle permet de mesurer l'énergie de surface du liquide ou du solide. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide/solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

Par « **CMI** », on entend la concentration minimale à partir de laquelle un agent inhibe la croissance visible d'un microorganisme après incubation sur la nuit. Les méthodes de détermination de la CMI d'un agent sont bien connues dans l'état de l'art.

Les exemples qui suivent montrent des modes de réalisation particuliers de l'invention, qui illustrent non limitativement l'invention.

[Description succincte de la figure]

La Figure 1, qui se lit en regard de l'exemple 1 ci-dessous, est un graphe illustrant le pouvoir filmant des EPS, avec en abscisse la durée de l'expérimentation c'est-à-dire le temps d'exposition des surfaces filmées et non filmées à une eau de mer circulante, et en ordonnée le taux de recouvrement de la surface par les EPS.

[Exemples]**Exemple 1 – Efficacité des EPS pour limiter la contamination par biofilm bactérien indésirable**

De nombreux EPS ont été testés. Sont reportés sur la figure 1 les résultats obtenus avec les

5 EPS suivant : HYD 721, MS 907, ST 716, HYD 1545, HYD 1644, GY 785 et HYD 657.

La méthode, générale, est expliquée en regard des 4 EPS suivants :

HYD 657

GY 785

HYD1545

10 HYD1644

Ces EPS sont connus de l'art antérieur, et décrits notamment dans les publications suivantes :

- 15 • (HYD 657) : Cambon-Bonavita M.A., G. Raguénès, J. Jean, P. Vincent and J. Guézennec. (2002). A novel polymer produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 310-315,
- 20 • (GY 785) : Raguénès G, Peres A, Ruimy R, Pignet P, R Christen R, Loaec M, Rougeaux H, Barbier G and Guezennec, J. (1997). *Alteromonas infernus* sp.nov, a new polysaccharide producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J. Appl. Bacteriol.* 82: 422-430,
- 25 • (HYD 1545) : Vincent, P., Pignet, P., Talmont F, Bozzi, L., Fournet, B., Milas, M., Guezennec, J., Rinaudo M and Prieur, D. (1994). Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol* 60(11) : 4134-4141,
- 30 • (HYD 1644) : Dubreucq G, Domon B, Fournet B (1996) Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr Res* 290:175–181,

- Guezennec, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 29: 204-208.

5 *Expérimentations :*

Des échantillons d'acier inoxydable 316L ont été utilisés pour les études portant sur l'influence d'un prétraitement des surfaces par des biopolymères issus de fermentation bactérienne. Les échantillons d'acier ont été pré-conditionnés par immersion dans une eau osmosée additionnée de protéines et/ou d'exopolysaccharides bactériens résultant de procédés biotechnologiques de fermentation à une concentration de 200 mg/litre (soit 0,02% poids/volume). Après deux heures de contact à une température constante de 20°C, les différents échantillons ont été rincés avec 200 ml d'eau physiologique puis séchées sous hotte à flux laminaire avant expérimentation. Des échantillons non pré-conditionnés ont été utilisés comme références.

Les essais d'adhésion en régime dynamique ont été réalisés en utilisant une eau de mer circulante non renouvelée. Le suivi de la colonisation bactérienne des échantillons non conditionnés et conditionnés par différents exopolysaccharides a été réalisé via un microscope électronique équipé d'une caméra relié à un ordinateur et en utilisant des cellules d'adhésion en dynamique.

Les pré-conditionnements des surfaces par quelques exopolysaccharides ont conduit à des réductions sensibles du pourcentage de recouvrement des supports (acier inoxydable 316L) testés. Après 120 heures d'expérimentation et sans renouvellement du conditionnement par adjonction complémentaire d'exopolymères dans le dispositif expérimental, les taux de contamination (de recouvrement par les bactéries) sont restés compris entre 5 et 10%.

Ainsi, ces mesures réalisées en eau de mer naturelle circulante ont démontré des taux de recouvrement de surface (inox 316L et verre) par des bactéries marines, inférieurs à 10% après 6 jours d'exposition sans renouvellement du biofilm, comparativement à une valeur témoin de 70 % en l'absence d'un film de polysaccharide.

Exemple 2 : test démontrant l'absence d'activité antimicrobienne du film d'EPS.Principe :

Une culture bactérienne diluée est mise en contact dans des micropuits, avec une solution d'EPS à des concentrations connues. Le résultat est obtenu par mesure de la densité optique (DO) dans les puits après 18 h de pousse à 30°C. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration la plus basse à laquelle l'EPS inhibe la croissance des bactéries. La concentration minimale bactéricide (CMB) est la concentration la plus basse à laquelle l'EPS tue les bactéries.

Méthode :

Les tests ont été réalisés sur 3 bactéries :

- *Escherichia coli* SBS 363 (bacille Gram négatif)
- *Micrococcus luteus* CIP 53.45 (coque Gram positif)
- *Pseudomonas sp* (souche marine)

Un premier criblage a été réalisé sur tous les EPS à une concentration élevée (100 ou 500 µg/mL) pour repérer les EPS potentiellement actifs. Un second test a été réalisé avec une gamme de dilution des EPS actifs pour repérer la CMI. Le contenu des puits montrant une inhibition a été étalé sur milieu gélosé pour repérer la CMB.

Résultats: Aucun EPS ne s'est révélé actif.

EPS	Concentrations testées	Activité antibactérienne (CMI µg/mL)		
		<i>E. coli</i> SBS 363	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>M. luteus</i> CIP 5345
GY 785	100 µg/mL	> 100	> 100	> 100
HYD 1545	100 µg/mL	> 100	> 100	> 100
HYD 1644	100 µg/mL à 1 ng/ml	> 100	> 100	> 100
HYD 657	500 et 100 µg/mL	> 500	> 500	> 500

Tableau récapitulatif des résultats

Exemple 3 : second test démontrant que le film d'EPS n'est pas biocidePrincipe :

Une culture bactérienne diluée est mise en contact dans des micropuits, avec une solution d'EPS à des concentrations connues. Le résultat est obtenu par mesure de la densité optique (DO) dans les puits après 18 h de pousse à 30°C. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration la plus basse à laquelle l'EPS inhibe la croissance des bactéries. La concentration minimale bactéricide (CMB) est la concentration la plus basse à laquelle l'EPS tue les bactéries.

10 Méthode :

Les tests ont été réalisés sur 4 bactéries et 1 levure:

- *Escherichia coli* ATCC 8739 (bacille Gram négatif)
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (bacille Gram positif)
- 15 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (bacille Gram négatif)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (coque Gram positif)
- *Candida albicans* ATCC 10231 (levure)

Chaque EPS a été mis en solution dans de l'eau stérile à 1 mg/mL puis dilué à 0,5 mg/mL et 0,25 mg/mL. Ces solutions ont été utilisées pour réaliser les tests antimicrobiens aux concentrations finales 100 µg/mL, 50 µg/mL et 25 µg/mL.

Le contenu des puits montrant une inhibition a été étalé sur milieu de culture gélosé pour déterminer la CMB.

25 Résultats :

Aux concentrations testées, les souches poussent en présence de n'importe quel EPS.

EPS	Concentrations testées (µg/mL)	Activité antibactérienne (CMI µg/mL)				
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
GY 785	100 – 50 – 25	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
HYD 1545	100 – 50 – 25	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
HYD 1644	100 – 50 – 25	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
HYD 657	100 – 50 – 25	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'exopolysaccharides (EPS) en tant qu'agent de prévention de la formation, sur une surface, d'un biofilm microscopique.

5 2. Utilisation d'exopolysaccharides selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits EPS comprennent des oses neutres, de préférence glucose, rhamnose, mannose ou galactose ; des oses acides, de préférence des acides uroniques tels que acide glucuronique, acide galacturonique ou acide hexuronique ; des oses aminés, de préférence N acétyl glucosamine ou N acétyl galactosamine ; des sulfates et/ou des protéines.

10 3. Utilisation d'exopolysaccharides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que lesdits EPS sont obtenus par fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds.

4. Utilisation d'exopolysaccharides selon la revendication 3, caractérisée en ce que lesdites bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds sont du genre
15 *Alteromonas* ou *Pseudoalteromonas*.

5. Utilisation d'exopolysaccharides selon l'une quelconque des revendications 3 à 4, caractérisée en ce que lesdits exopolysaccharides sont obtenus par fermentation de bactéries *Alteromonas macleodii* ou *Alteromonas infernus*.

6. Utilisation d'exopolysaccharides selon l'une quelconque des revendications
20 1 à 5, caractérisée en ce que lesdits exopolysaccharides sont choisis parmi HYD 657, HYD 1644, HYD 1545, GY 785, MS 907, ST 716, HYD 721, GY 772, HYD 750, GY 768, GY 788, BI746, GY 786, GY 685, GY 686, ST 719, HYD 1574, HYD 1579, HYD 1582, HYD 1584, ST 708, ST 722, ST 342, ST 349, HYD 1625, et HYD 1666.

7. Utilisation d'exopolysaccharides selon l'une quelconque des revendications
25 1 à 6, caractérisée en ce que lesdits exopolysaccharides sont associés à l'acide zostérique ou à l'un de ses dérivés.

8. Utilisation d'exopolysaccharides selon l'une quelconque des revendications

1 à 7, caractérisée en ce que lesdits exopolysaccharides sont associés à un ou plusieurs PAM.

9. Procédé de protection d'une surface par prévention de la formation d'un biofilm microscopique, comprenant l'utilisation d'exopolysaccharides selon l'une
5 quelconque des revendications **1 à 9**, caractérisé en ce que l'on forme un film protecteur d'exopolysaccharides sur ladite surface par mise en contact ou greffage de ladite surface avec au moins un exopolysaccharide.

10. Procédé selon la revendication **9**, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de suivi de la formation ou de l'état du film d'exopolysaccharides résultant de la
10 mise en contact ou du greffage de ladite surface avec au moins un exopolysaccharide par tout moyen physico-chimique adapté.

11. Procédé selon la revendication **9**, caractérisé en ce que ladite surface est métallique, en ce que ledit moyen physicochimique est la mesure de la variation de potentiel électrochimique de ladite surface.

12. Procédé selon l'une des revendications **9 à 11**, caractérisé en ce que la mise
15 en contact est effectuée ponctuellement ou à intervalles réguliers, de préférence par injection d'une solution d'EPS de concentration de 0.001 à 10%, de préférence 0.01 à 1% en poids par rapport au volume total de la solution, à proximité d'une surface.

13. Procédé de modification des caractéristiques physiques d'une surface de
20 telle manière que l'adhésion d'un biofilm bactérien indésirable sur ladite surface se trouve limitée, comprenant l'utilisation d'exopolysaccharides selon l'une quelconque des revendications **1 à 8**, caractérisé en ce que l'on met en contact ou l'on greffe ladite surface avec un exopolysaccharide.

14. Surface recouverte d'exopolysaccharides, obtenue par utilisation
25 d'exopolysaccharides selon l'une quelconque des revendications **1 à 8**, ou par le procédé selon l'une quelconque des revendications **9 à 12**.

15. Produit comprenant une surface selon la revendication **14**.

16. Produit selon la revendication **15**, caractérisé en ce que ledit produit est une canalisation ou un terminal méthanier.

17. Produit selon la revendication **15**, caractérisé en ce que ledit produit est un outil hospitalier, de préférence un tube ou un cathéter.

1/1

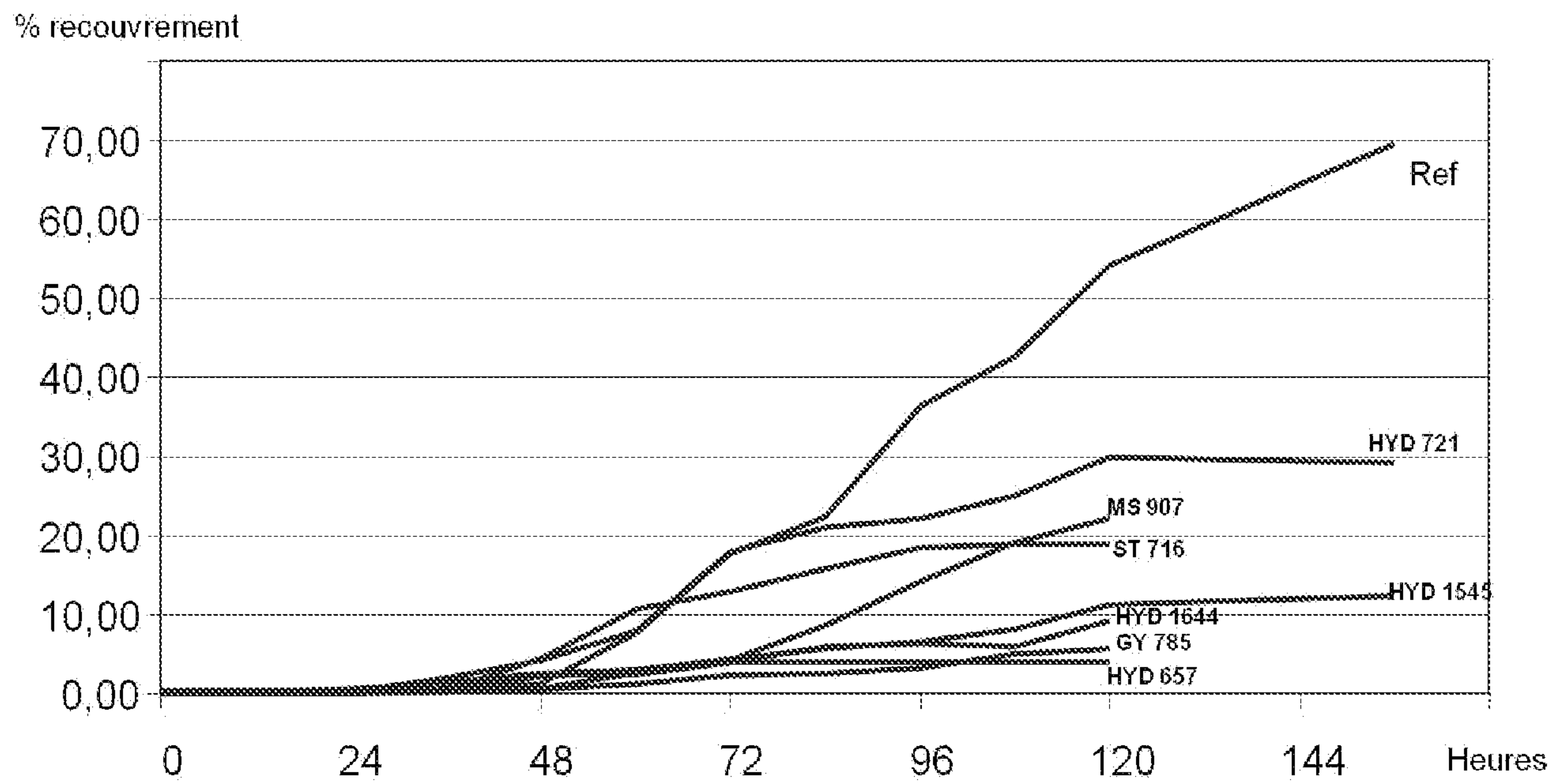


FIG. 1